

SÉRIE A N° 2520
N° D'ORDRE : 3392

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

PIOTR SŁONIMSKI

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA FORMATION DES ENZYMES
RESPIRATOIRES CHEZ LA LEVURE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 25 avril 1952 devant la Commission d'Examen :

MM. AUBEL *Président.*

EPHRUSSI
WURMSER } *Examineurs.*

ÉDITIONS DESOER
LIÈGE
1953

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. A. CHÂTELET.

PROFESSEURS

MM.		MM.	
G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LAFFITTE	T Chimie générale.
A. DENJOY	T Théorie des Fonctions.	FAVARD	T Mécanique générale.
L. LUTAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique.	COULOMB	T Physique du Globe.
E. DARMOIS	T Enseignement de Physique.	M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (P. C. B.).
Robert LÉVY	T Physiologie comparée.	CHRÉTIEN	T Chimie minérale.
M ^{me} RAMART-LUCAS.	T Chimie organique.	P. DRACH	T Zoologie.
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	KASTLER	T Physique.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	CHATELET	T Arithmétique et théorie des nombres.
De BROGLIE	T Théories physiques.	EPHRUSSI	T Génétique.
JOB	T Chimie générale.	WURMSER	T Biologie physico-chimique.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	BAUER	T Chimie - Physique.
COMBES	T Physiologie végétale.	RIVIERE	T Géologie (P. C. B.).
GARNIER	T Géométrie supérieure.	GAUTHERET	T Biologie Végétale (P. C. B.).
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et applications.	LUCAS	T Physique.
LAUGIER	T Physiologie générale.	A. THOMAS	T Evolution des êtres organisés.
TOUSSAINT	T Technique Aéronautique.	ARNULF	T Optique appliquée.
M. CURIE	T Physique (P. C. B.).	MAX MORAND	T Physique.
G. RIBAUD	T Hautes températures.	SOLEILLET	T Physique.
CHAZY	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.
CROZE	T Physique théorique et physique céleste.	DANJON	T Astronomie.
DUPONT	T Théories chimiques.	FROMAGEOT	T Chimie biologique.
VALIRON	T Calcul différentiel et Calcul intégral.	LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité.
BARRABÉ	T Géologie structurale et géologie appliquée.	JANET	T Mathématiques générales.
VAVON	T Analyse et mesures chimiques.	PETIT	T Biologie maritime.
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.
Jacques BOURCART .	T Géographie physique et Géologie dynamique.	GALLIEN	T Biologie animale (P. C. B.).
AUBEL	T Chimie biologique.	EICHHORN	T Biologie végétale (P. C. B.).
M ^{me} JOLIO-CURIE .	T Physique générale et Radioactivité.	DE CUGNAC	T Biologie végétale (P. C. B.).
PLANTEFOL	T Botanique.	M ^{lle} CAUCHOIS . . .	T Chimie - Physique.
CABANNES	T Recherches physiques.	THELLIER	T Physique du Globe.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	AUDUBERT	T Electrochimie.
PRÉVOST	T Chimie organique.	L'HÉRITIER	T Génétique.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	GRIVET	T Radio Electricité.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
WYART	T Minéralogie.	THIRY	T Mécanique appliquée.
TEISSIER	T Zoologie.	DUBREIL	T Mathématiques générales.
MANGENOT	T Biologie végétale.	QUELET	T Chimie (P. C. B.).
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
MONNIER	T Physiologie générale.	CHAMPETIER	T Chimie appliquée.
PIVETEAU	T Géologie.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
ROCARD	T Physique.	JUNG	T Pétrographie.
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. Supérieure).	TRILLAT	T Physique (P. C. B.).
SCHAEFFER	T Physiologie des fonctions.	WIEMANN	T Chimie (P. C. B.).
		LICHNEROWICZ . . .	T Mathématiques générales.
		JACQUINOT	T Physique (P. C. B.).
		VASSY	T Physique de l'atmosphère.
		DESTOUCHES	T Théories physiques.
		M. PRUVOST	T Géologie.
		AMIEL	T Chimie (P. C. B.).
		HOCART	T Minéralogie.
		MACHEBŒUF	T Microbiologie.
		J.-P. MATHIEU . . .	T Physique (P. C. B.).
		COUTEAUX	T Biologie animale (P. C. B.).
		MAY	T Biologie animale (P. C. B.).

CH. MONIER. Secrétaire

SÉRIE A N° 2520
N° D'ORDRE : 3392

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

PIOTR SŁONIMSKI

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA FORMATION DES ENZYMES
RESPIRATOIRES CHEZ LA LEVURE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 25 avril 1952 devant la Commission d'Examen :

MM. AUBEL *Président.*

EPHRUSSI
WURMSER } *Examineurs.*

ÉDITIONS DESOER
LIÈGE
1953

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. A. CHÂTELET.

PROFESSEURS

MM.		MM.	
G. JULIA	T Analyse supérieure et	LAFFITTE	T Chimie générale.
A. DENJOY	T Algèbre supérieure.	FAVARD	T Mécanique générale.
L. LUTAUD	T Théorie des Fonctions.	COULOMB	T Physique du Globe.
E. DARMOIS	T Géographie physique et	M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (P. C. B.).
Robert LÉVY	T Géologie dynamique.	CHRÉTIEN	T Chimie minérale.
M ^{me} RAMART-LUCAS.	T Enseignement de Physique.	P. DRACH	T Zoologie.
FOCH	T Physiologie comparée.	KASTLER	T Physique.
PAUTHENIER	T Chimie organique.	CHATELET	T Arithmétique et théorie des
De BROGLIE	T Mécanique physique et ex-		nombre.
JOB	périmentale.	EPHRUSSI	T Génétique.
PRENANT	T Electrotechnique générale.	WURMSER	T Biologie physico-chimique.
COMBES	T Théories physiques.	BAUER	T Chimie - Physique.
GARNIER	T Chimie générale.	RIVIERE	T Géologie (P. C. B.).
PÈRÈS	T Anatomie et Histologie	GAUTHERET	T Biologie Végétale (P. C. B.).
LAUGIER	comparées.	LUCAS	T Physique.
TOUSSAINT	T Physiologie végétale.	A. THOMAS	T Evolution des êtres organi-
M. CURIE	T Géométrie supérieure.		sés.
G. RIBAUD	T Mécanique des fluides et	ARNULF	T Optique appliquée.
CHAZY	applications.	MAX MORAND	T Physique.
CRÖZE	T Physiologie générale.	SOLEILLET	T Physique.
DUPONT	T Technique Aéronautique.	FORTIER	T Mécanique expérimentale
VALIRON	T Physique (P. C. B.).		des fluides.
BARRABÉ	T Hautes températures.	DANJON	T Astronomie.
VAVON	T Mécanique analytique et	FROMAGEOT	T Chimie biologique.
G. DARMOIS	Mécanique céleste.	LAPORTE	T Physique générale et Ra-
Jacques BOURCART .	T Physique théorique et phy-		dioactivité.
AUBEL	sique céleste.	JANET	T Mathématiques générales.
M ^{me} JOLIOT-CURIE .	T Théories chimiques.	PETIT	T Biologie maritime.
PLANTFOL	T Calcul différentiel et Cal-	QUENEY	T Météorologie et dynamique
CABANNES	cul intégral.		atmosphérique.
GRASSÉ	T Géologie structurale et géo-	GALLIEN	T Biologie animale (P. C. B.).
PRÉVOST	logie appliquée.	EICHHORN	T Biologie végétale (P. C. B.).
BOULIGAND	T Analyse et mesures chi-	DE CUGNAC	T Biologie végétale (P. C. B.).
CHAUDRON	miques.	M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie - Physique.
WYART	T Calcul des probabilités et	THELLIER	T Physique du Globe.
TEISSIER	Physique mathématique.	AUDUBERT	T Electrochimie.
MANGENOT	T Géographie physique et	L'HÉRITIER	T Génétique.
P. AUGER	Géologie dynamique.	GRIVET	T Radio Electricité.
MONNIER	T Chimie biologique.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
PIVETEAU	T Physique générale et Ra-	THIERY	T Mécanique appliquée.
ROCARD	dioactivité.	DUBREIL	T Mathématiques générales.
H. CARTAN	T Botanique.	QUELET	T Chimie (P. C. B.).
SCHAEFFER	T Recherches physiques.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
	T Evolution des êtres orga-	CHAMPETIER	T Chimie appliquée.
	nisés.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géol-
	T Chimie organique.		ogie appliquée.
	T Application de l'analyse à	JUNG	T Pétrographie.
	la Géométrie.	TRILLAT	T Physique (P. C. B.).
	T Chimie appliquée.	WIEMANN	T Chimie (P. C. B.).
	T Minéralogie.	LICHNEROWICZ . . .	T Mathématiques générales.
	T Zoologie.	JACQUINOT	T Physique (P. C. B.).
	T Biologie végétale.	VASSY	T Physique de l'atmosphère.
	T Physique quantique et	DESTOUCHES	T Théories physiques.
	relativité.	M. PRUVOST	T Géologie.
	T Physiologie générale.	AMIEL	T Chimie (P. C. B.).
	T Géologie.	HOCART	T Minéralogie.
	T Physique.	MACHEBEUF	T Microbiologie.
	T Mathématiques	J.-P. MATHIEU . . .	T Physique (P. C. B.).
	(E. N. Supérieure).	COUTEAUX	T Biologie animale (P. C. B.).
	T Physiologie des fonctions.	MAY	T Biologie animale (P. C. B.).

CH. MONIER. Secrétaire.



*A la mémoire de mes parents
morts à Varsovie.*

A E. P.

A Monsieur Boris EPHRUSSI
*en témoignage de ma profonde
reconnaissance et de mon
affection.*

Ces recherches ont été entièrement réalisées au Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences et de l'Institut de Biologie Physico-Chimique sous la direction de M. le Professeur Boris EPHRUSSI. En lui dédiant ce travail, j'ai tenu à lui témoigner toute ma gratitude pour sa bienveillance, ses critiques et ses précieux conseils auxquels je dois beaucoup.

M. le Professeur E. AUBEL, qui a bien voulu accepter la présidence de cette Thèse, a toujours porté un vif intérêt à mes recherches. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également à M. le Professeur R. WURMSER pour ses conseils judicieux et à M. le Professeur Ph. L'HERITIER qui a porté un intérêt constant à mon travail.

Je remercie très sincèrement M^{lle} Gisèle PERRODIN, collaborateur technique au C. N. R. S., pour l'aide précieuse qu'elle n'a cessé de m'apporter dans l'exécution d'expériences délicates. Sans son concours dévoué, ce travail n'aurait pu être mené à bien.

Je n'oublie pas, non plus, la collaboration amicale et efficace de tous mes collègues du Laboratoire de Génétique, et, en particulier, celle de mon ami Jean TAVLITZKI ; leur esprit de camaraderie m'a grandement facilité la poursuite de ces recherches.

Il m'est agréable enfin de rappeler que ces études n'ont été rendues possibles que grâce à l'allocation d'attaché de recherches qui m'a été accordée par le Centre National de la Recherche Scientifique.

Je tiens à signaler d'autre part que ce travail a été facilité par une subvention du Damon Runyon Memorial Fund for Cancer Research au Laboratoire de Génétique.

La publication de cet ouvrage a été aidée par une subvention de M^{me} Bethsabée de ROTHSCHILD.

Je remercie ici les « Harvey Lectures » et les Editions C. Thomas, Springfield qui m'ont autorisé à reproduire les figures 10 et 33.

1. ORIGINE DU TRAVAIL, POSITION DU PROBLÈME ET PLAN DE L'EXPOSÉ

Il est généralement admis que la totalité de l'énergie nécessaire à la vie d'une cellule lui est fournie par des séries de processus d'oxydo-réduction dont elle est à chaque instant le siège. Qu'il s'agisse du travail mécanique d'une cellule du muscle, du travail osmotique d'une cellule du rein, du travail des synthèses au cours de la croissance d'une cellule de levure, l'énergie et certains éléments utilisés dans la construction du protoplasme sont empruntés principalement au catabolisme des glucides qui sont l'aliment énergétique le plus commun pour les cellules hétérotrophes. Selon la nature de l'accepteur final de l'hydrogène métabolique qui peut être l'oxygène moléculaire ou toute autre substance, les réactions du catabolisme glucidique productrices d'énergie appartiennent soit à la respiration, soit à la fermentation. L'intérêt que suscitent ces processus fondamentaux ne cesse d'augmenter et, depuis PASTEUR, les recherches ont été poursuivies dans plusieurs directions : description des réactions chimiques qui sont à la base de la respiration et de la fermentation, et de leur mécanisme physico-chimique ; nature et propriétés des enzymes qui catalysent ces réactions ; orientation de diverses réactions dans le système hautement intégré qu'est la cellule ; relations entre la production d'énergie et les synthèses. A la suite de ces études, nos connaissances de la respiration et de la fermentation forment un tableau relativement cohérent, fondé sur un grand nombre de faits expérimentaux.

Or, la cellule possède deux propriétés fondamentales : la propriété de transmettre certains caractères à sa descendance, et la propriété de les changer, les nouvelles caractéristiques étant ou n'étant pas héréditaires. Autrement dit, pour un caractère donné, on doit se poser le problème de l'existence dans sa manifestation d'un déterminisme héréditaire d'une part, et, de l'autre, rechercher la contribution qui revient au déterminisme non héréditaire. Le but du présent travail est d'aborder le problème de l'interaction entre le milieu extérieur et le génotype dans la genèse des enzymes d'oxydo-réduction. Nos connaissances sur la génétique de la formation de ces enzymes sont rudimentaires, celles sur le déterminisme phénotypique le sont presque, et une telle étude nous semble être justifiée par l'importance physiologique des processus d'oxydoréduction.

Les recherches sur le *déterminisme héréditaire* de la respiration cellulaire ont été rendues possibles par les travaux d'EPHRUSSI et

de ses collaborateurs sur la génétique de la levure. Ce matériel biologique, grâce à l'existence d'une phase sexuelle, réunit les avantages de se prêter à l'analyse par les méthodes classiques de la Génétique et d'être des mieux connus au point de vue biochimique. En 1949, EPHRUSSI, HOTTINGUER et CHIMENES ont décrit chez la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) une mutation affectant la taille des colonies (mutation « petite colonie »). Ils ont montré que cette mutation peut être induite par l'acriflavine chez plusieurs races et espèces de levures (EPHRUSSI, L'HERITIER et HOTTINGUER, 1949). Puisque la réduction de la taille de la colonie chez ce mutant est due à la diminution du rendement de croissance (TAVLITZKI, 1949), l'étude du métabolisme fut entreprise. Elle a montré que les souches mutantes (« petites ») sont caractérisées par une déficience respiratoire (SLONIMSKI, 1949 *a*) qui, à son tour, est due à l'abolition de la formation de plusieurs constituants du système des cytochromes (SLONIMSKI et EPHRUSSI, 1949). Il est ainsi devenu clair que l'on se trouvait en présence de races de levures qui permettaient d'étudier le déterminisme héréditaire de la biosynthèse des catalyseurs d'oxydo-réduction. Une telle étude présente deux aspects complémentaires : l'aspect génétique qui consiste à décrire et à localiser des « déterminants » héréditaires qui différencient les diverses souches, et l'aspect physiologique, où, après avoir donné la description aussi complète que possible des effets de la mutation, on essaie de remonter la chaîne causale jus'qu'aux « déterminants ». On peut espérer que cette double étude permettra de traduire le contrôle génétique dans le langage de la biochimie. Le premier de ces aspects a été abordé par EPHRUSSI et ses collaborateurs (EPHRUSSI, HOTTINGUER et TAVLITZKI, 1949 ; CHEN, EPHRUSSI et HOTTINGUER, 1950 ; EPHRUSSI et HOTTINGUER, 1950), et les conclusions obtenues peuvent être résumées brièvement sous la forme suivante : le caractère normal de la respiration est conditionné chez la levure par la présence simultanée d'un facteur héréditaire cytoplasmique et par la présence d'au moins un facteur héréditaire nucléaire ; le facteur extranucléaire, particulière et autoreproductible est indépendant de ce gène mendélien dominant quant à sa reproduction, mais en dépend pour son fonctionnement, de sorte que le phénotype « petite colonie » peut être dû à la mutation du gène (« petites ségrégantes »), à la perte (ou mutation ?) du facteur cytoplasmique (« petites végétatives ») ou bien à ces deux causes à la fois (« petites doubles »). Notre travail est consacré exclusivement à l'étude des « petites végétatives » chez lesquelles la déficience respiratoire est le résultat de la perte ou de la mutation du facteur extranucléaire.

Dans le chapitre 2 on décrira le matériel et les méthodes utilisées au cours du présent travail. L'aspect physiologique du déterminisme héréditaire, abordé dans les publications préliminaires de SLONIMSKI (1949, *a, b*) et de SLONIMSKI et EPHRUSSI (1949) sera exposé dans le chapitre 3 ⁽¹⁾. Il consistera essentiellement dans l'étude comparée des souches qui diffèrent par la présence ou l'absence du facteur cytoplasmique héréditaire et qui ont proliféré dans des conditions identiques en aérobiose. Après avoir passé rapidement en revue l'état de nos connaissances sur la respiration et la fermentation de la levure, on étudiera dans le paragraphe 3.2 le métabolisme global, aérobie et anaérobie, des cellules intactes. La description du métabolisme endogène sera suivie de l'étude du métabolisme des sources exogènes d'énergie (glucose, corps en C₂-C₄). On comparera ensuite l'action de certains inhibiteurs, tels que l'acide monoiodoacétique, le fluorure et le cyanure. A la fin du paragraphe 3.2, il sera question de quelques problèmes, tels que celui de la permanence de la mutation et de l'identité physiologique des mutants spontanés et induits par l'acriflavine, qui complètent l'aspect génétique formel. Le paragraphe 3.3 traitera des systèmes enzymatiques de la respiration « terminale » afin de préciser le point d'attaque de la mutation. Ceci nous permettra en outre d'étudier les relations qui existent entre les divers systèmes enzymatiques intégrés de la cellule. Après l'étude spectroscopique des cytochromes, on comparera les réactions successives d'oxydo-réductions menant à l'oxygène. La cytochrome-oxydase sera étudiée avec le plus de détails, car elle occupe une position-clef dans la respiration cellulaire et n'a été étudiée jusqu'ici qu'extraite de tissus animaux. Etant donné que la majeure partie des enzymes dont la formation est affectée par la mutation sont des hémoprotéines, on donnera le résultat des dosages des hémines et de leur distribution. Le paragraphe 3.3 se terminera par la description des expériences sur la localisation des enzymes d'oxydo-réduction dans le cytoplasme des cellules normales et mutantes. Dans la discussion du chapitre 3 (§§ 3.25 et 3.37) on confrontera les résultats de nos expériences personnelles avec ceux de l'étude génétique ainsi qu'avec les données fournies par la littérature.

Puisque le phénotype d'une cellule est le résultat de l'interaction entre le milieu externe et le génotype, nous étudierons un exemple de *déterminisme non-héréditaire*, à savoir l'influence de l'oxygène sur la formation des enzymes d'oxydo-réduction (chapitre 4). Cette étude a pour point de départ l'observation (EPHRUSSI et

(1) Ce travail étant beaucoup plus complet que les publications préliminaires, les données contenues dans ces dernières sont incorporées sans autre mention dans le texte.

SLONIMSKI, 1950 ; SLONIMSKI, 1950) que l'oxygène conditionne d'une façon rigoureuse et avec une ampleur insoupçonnée la synthèse même de certains enzymes catalysant la libération d'énergie. Ses résultats contribuent en outre à la compréhension plus exacte du mécanisme du contrôle génétique de la formation de ces enzymes. Dans le paragraphe 4.1, on décrira brièvement les modalités de la croissance des levures en présence et en absence d'oxygène. On comparera ensuite les propriétés métaboliques et la constitution enzymatique des souches normales et mutantes ayant proliféré soit en anaérobiose, soit en aérobiose. Les expériences décrites dans les paragraphes 4.32 et 4.4 montreront que l'oxygène induit la synthèse de plusieurs enzymes respiratoires, même en absence de multiplication cellulaire et que sa présence n'est pas nécessaire à la formation des catalyseurs de la fermentation. Un autre phénomène nouveau, qui révèle l'instabilité du pouvoir fermentaire chez les levures cultivées en anaérobiose et séparées de leur milieu nutritif sera décrit dans le paragraphe 4.41. Comme les changements de la constitution enzymatique dus à la prolifération en absence d'oxygène sont accompagnés de l'excrétion dans le milieu de culture de porphyrines, on étudiera dans le paragraphe 4.5 les modalités de ce phénomène. Dans la discussion du chapitre 4, nous analyserons le mécanisme de l'intervention de l'oxygène dans la formation des enzymes et nous comparerons certains aspects de ce mécanisme avec ceux de quelques synthèses adaptatives d'enzymes.

* * *

Les recherches relatées dans cet ouvrage ont été entièrement réalisées au Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de Paris et de l'Institut de Biologie Physico-Chimique sous la direction de M. le Professeur Boris EPHRUSSI. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour sa bienveillance, ses critiques et ses précieux conseils auxquels je dois beaucoup.

Mes remerciements vont également à MM. les Professeurs E. AUBEL, R. WURMSER et Ph. L'HÉRITIER qui ont porté un intérêt constant à mon travail.

Je remercie très sincèrement M^{lle} Gisèle PERRODIN, collaborateur technique au C. N. R. S., pour l'aide précieuse qu'elle n'a cessé de m'apporter dans l'exécution d'expériences délicates. Sans son concours dévoué, ce travail n'aurait pu être mené à bien.

Je n'oublie pas, non plus, la collaboration amicale et efficace de tous mes collègues du Laboratoire de Génétique, et, en particulier, celle de mon ami Jean TAVLITZKI ; leur esprit de camaraderie m'a grandement facilité la poursuite de ces recherches.

Il m'est agréable enfin de rappeler que ces études n'ont été rendues possibles que grâce à l'allocation d'attaché de recherches qui m'a été accordée par le Centre National de la Recherche Scientifique.

Je tiens à signaler d'autre part que ce travail a été facilité par une subvention du Damon Runyon Memorial Fund for Cancer Research au Laboratoire de Génétique.

Je remercie M. le Professeur M. FLORKIN d'avoir accepté ce travail dans la collection des Actualités Biochimiques qu'il dirige. La publication de cet ouvrage a été aidée par une subvention de M^{me} Bethsabée de ROTHSCHILD.

Je remercie ici les « Harvey Lectures » et les éditions C. Thomas, Springfield qui m'ont autorisé à reproduire les figures 10 et 33.

2. MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉES

2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Nous donnons ci-dessous la liste des souches de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) utilisées au cours de ce travail

Souches diploïdes :

1) *B II* : levure de boulangerie provenant de la collection du Laboratoire des Fermentations de l'Institut Pasteur de Paris.

2) *Yeast Foam* : levure de boulangerie provenant de la collection du Professeur O. WINGE de Copenhague.

A partir de ces souches diploïdes, les souches haploïdes suivantes ont été établies au laboratoire par isolement d'ascospores à l'aide du micromanipulateur de Fonbrunne :

3) *59 R* à partir de 1).

4) *160* à partir de 1).

5) *276/3b* à partir de 2).

Au cours de la multiplication végétative de ces lignées haploïdes, les souches mutantes suivantes ont été isolées par étalement sur gélose et prélèvements de colonies :

6) *59 Rp*, mutant « petite colonie » apparu spontanément dans une culture de 3).

7) *160 p*, mutant « petite colonie » apparu spontanément dans une culture de 4).

8) *59 RA*, mutant « petite colonie » apparu à la faveur d'un traitement par acriflavine d'une culture de 3).

9) *160 A*, mutant « petite colonie » apparu à la faveur d'un traitement par acriflavine d'une culture de 4).

10) *276/3br*, mutant rouge, exigeant l'adénine pour proliférer, apparu spontanément dans la culture de 5).

11) *1 sp. No 1*, mutant « petite colonie » (blanc), exigeant l'adénine pour proliférer, apparu spontanément dans une culture de 10).

12) *1 A No 1*, mutant « petite colonie » (blanc), exigeant l'adénine pour proliférer, apparu à la faveur d'un traitement par acriflavine d'une culture de 10).

Les souches 1, 2, 4, 5, 7 à 9, 12 sont maintenues à la température du laboratoire depuis leur isolement par des repiquages trimestriels sur milieu gélosé (No 1 g).

Les souches 3, 6, 8 sont entretenues à 25° sur le même milieu non gélosé (No 1) par des repiquages tous les deux ou trois jours, ce qui correspond (EPHRUSSI et coll., 1949) à environ six générations cellulaires par passage. Les expériences principales portent sur des souches 3, 6, 8 ayant subi, depuis leur isolement et jusqu'au moment de l'expérience, 170 à 650 passages en milieu liquide.

A titre de comparaison, nous avons, dans certains cas, étudié une levure de boulangerie du commerce Springer, achetée à Paris et une levure de brasserie basse provenant de la brasserie Graff de Rennes.

2.2. MATÉRIEL CHIMIQUE

1. L'azote utilisé est celui fourni par la Société « Air Liquide », selon laquelle il contient $< 0,005\%$ d'oxygène. Il est utilisé sans purification supplémentaire. Certaines expériences ont été effectuées avec l'azote contenant $< 0,3\%$ d'O₂. Dans ce dernier cas, il était purifié par passage dans une colonne contenant soit du sulfate chromeux (STONE, 1936), soit une solution fraîchement préparée d'hydrosulfite de Na en milieu alcalin.

2. Les tampons phosphate sont préparés selon SÖRENSEN (cf. CLARK, 1928).

3. Le cytochrome *c* utilisé provient soit de nos propres préparations selon la technique de KEILIN et HARTREE (1937) à partir de cœur de cheval, soit des maisons Tremond Sales Co. et Bios. Avant usage, les solutions sont dialysées à froid contre une solution de Na Cl à 0,5 % dans de l'eau bidistillée sur pyrex. La technique du dosage du cytochrome *c* est décrite au paragraphe 2.6.

4. Le CoI (diphosphopyridine nucleotide) provient de la maison Schwartz. L'estimation par la technique de SLATER (1950 b) a révélé que la préparation contient 38 % de CoI pur.

Le CoIH₂ est préparé par la réduction à l'aide de l'hydrosulfite de Na selon la modification apportée par SLATER (1950 b) à la méthode d'OHLMEYER (1938). Les calculs de la concentration du CoIH₂ sont effectués en admettant ε_{mM} à 340 m μ = 6,22 (HORECKER et KORNBERG, 1948).

Les solutions, gardées à 0-4°, ne sont utilisées que pendant les trois jours qui suivent leur préparation.

5. Le chlorhydrate de diméthylparaphénylènediamine et l'hématoporphyrine ont été synthétisés par M. PARROD, de l'Institut de Biologie physico-chimique, Paris.

2.3. MÉTHODES DE CULTURE

Les caractéristiques d'une population cellulaire dépendent en grande partie des conditions de culture. Il a donc été nécessaire de standardiser celles-ci. On trouvera ci-dessous la composition des principaux milieux de culture et la description des diverses techniques.

2.31. Milieux de culture

Milieux naturels.

N° 1) Glucose 30 g
 $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 2 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
 Eau de touraillons ⁽¹⁾ à 3% q. s. p. 1000 cm³
 Stérilisation par autoclavage pendant 20 minutes à 120°.
 pH après stérilisation 5,8-5,9.

N° 1g) Même milieu que le précédent, additionné de 20 g d'agar par litre. Stérilisation et pH comme pour le milieu N° 1.

N° 2) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,7 g
 KH_2PO_4 1,0 g
 CaCl_2 0,4 g
 NaCl 0,5 g
 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1,2 g
 FeCl_3 0,005 g
 Glucose 40,0 g
 Extrait de touraillons 2 p. 1000
 Eau distillée q. s. p. 1000 cm³
 Stérilisation par autoclavage pendant 20 minutes à 120°.
 pH après stérilisation 5,2-5,4.

N° 3) Constante saline comme dans le N° 2.
 Glucose 54,0 g
 Yeast extract Difco 10,0 g
 Eau distillée q. s. p. 1000 cm³
 Stérilisation par autoclavage à 107° pendant 60 minutes.
 pH après stérilisation 5,7-5,9.

⁽¹⁾ L'eau de touraillons est préparée en faisant bouillir pendant 20 min. 30 g de touraillons secs dans 1 litre d'eau. L'extrait obtenu est filtré avant d'être additionné de sels et de glucose.

Milieux synthétiques.

N° 4) Constante saline comme dans le N° 2.

Glucose	30,0 g
β alanine	6 mg
Biotine	0,6 γ
Eau distillée	q. s. p. 1000 cm ³

Stérilisation par autoclavage pendant 20 minutes à 120°.
pH après stérilisation 4,2-4,4.

N° 5) Constante saline comme dans le N° 2.

Glucose	30,0 g
Panthoténate de Ca	1 mg
Biotine	2,5 γ
Acide nicotinique	1 mg
Thiamine	1 mg
Riboflavine	1 mg
Inositol	5 mg
Ac. para-amino-benzoïque	0,5 mg
Pyridoxine	1 mg
Eau distillée	q. s. p. 1000 cm ³

Stérilisation et pH comme N° 4.

N° 4g et 5g)

Milieux N° 4 et N° 5 additionnés de 20 g d'agar par litre.

Stérilisation et pH comme N° 4.

2.32. Techniques de culture

Les cultures sont obtenues en ensemençant une quantité connue de levure provenant soit de la culture « stock » entretenue comme il était indiqué au paragraphe 2.1, soit, lorsqu'une quantité plus grande d'inoculum est requise, d'une « préculture ». Cette dernière est obtenue en ensemençant une anse de la culture « stock » dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 cm³ contenant 25 cm³ du milieu choisi. Ce milieu est le même que celui utilisé pour la culture principale. Au bout de 24 heures à 28°, on mesure la densité par néphélométrie et on calcule le volume de la préculture nécessaire pour obtenir l'inoculum voulu.

Sauf indication spéciale, toutes les cultures sont faites à 28°.

Culture sur milieu solide.

I. En aérobiose : 0,1 cm³ d'une suspension de levures (contenant 10³ à 10⁴ cellules) de la culture « stock » est étalé sur la surface du milieu contenu dans une boîte de Petri (volume du milieu gélosé :

env. 30 cm³). Pour assurer l'aération, une feuille de papier filtre est insérée entre les bords de la boîte. Incubation à 25°.

II. En anaérobiose : les boîtes ensemencées comme précédemment sont placées dans un dessiccateur relié par un tube en T à une pompe à huile et à une bouteille d'azote. Après avoir fait le vide (10 mm Hg), on remplit le dessiccateur avec de l'azote. La manipulation est répétée trois fois. Au cours du dernier remplissage, on laisse un vide léger pour éviter la surpression due au dégagement de CO₂ au cours de la croissance. Incubation à 25°.

Culture en milieu liquide.

III. Des fioles d'Erlenmeyer de 100 cm³ contenant 25 cm³ de milieu sont ensemencées avec une suspension de levures de la culture « stock ». Les fioles bouchées au coton sont agitées de temps en temps à la main.

IV. Afin d'obtenir une forte oxygénation au cours de la croissance, la culture est faite dans les « tubes à barbotage » décrits par TAVLITZKI (1949), contenant 50 cm³ de milieu. L'aération continue est assurée par le passage d'air comprimé stérile et humide qui traverse la culture sous forme de grosses bulles et dont le débit peut être réglé. L'ensemencement s'effectue à partir de la préculture.

V. Afin d'obtenir une croissance en anaérobiose, on utilise, lorsque le volume de culture n'est pas grand, des fioles d'Erlenmeyer de 200 cm³ contenant 150 cm³ de milieu. Après l'ensemencement avec des cellules de la préculture, les fioles sont fermées par des bouchons de caoutchouc traversés par deux tubes de verre munis de coton stérile dont un seul plonge dans le liquide de culture et l'autre, plus court, se termine par une soupape de mercure. Après avoir paraffiné les joints, l'air du récipient est remplacé par l'azote que l'on fait barboter pendant 60 minutes à la vitesse de 50 cm³ par minute. Les fioles sont placées dans une étuve et agitées mécaniquement.

VI. Tous les procédés indiqués ci-dessus ne permettent de manipuler que des volumes relativement faibles de milieu. Pour assurer l'aération maxima de plus grosses quantités de milieux naturels, sans que l'on soit obligé de recourir aux anti-mousses, nous avons utilisé un dispositif constitué par une bouteille de 10 litres (40 cm × Ø de 18 cm) en pyrex, contenant 1 litre de milieu et tournant horizontalement autour de son axe avec une vitesse de 150 tours par minute. Cette disposition permet le brassage continu du milieu et une très bonne aération de la culture dont une partie forme continuellement une couche mince à la surface intérieure de la bou-

teille. L'atmosphère de celle-ci est constamment renouvelée par injection d'air comprimé stérile et humidifié. Cette injection se fait par un tube qui pénètre par le trou central (dont le diamètre est de 2 mm plus grand que le diamètre extérieur du tube) du bouchon de caoutchouc qui ferme le goulot de la bouteille. Les prélèvements sont effectués stérilement à l'aide d'un tube courbé, qui est placé excentriquement dans ce même bouchon et qui plonge dans le milieu.

VII. Pour la culture de grosses quantités de levure en anaérobiose nous nous servons du même dispositif, légèrement modifié. La bouteille est bouchée par un bouchon de caoutchouc qui laisse passer deux tubes. Un de ceux-ci est placé dans un trou excentrique du bouchon et est coudé de façon à pouvoir plonger dans le liquide ; il sert à l'introduction du gaz et aux prélèvements d'échantillons de la culture qui peuvent se faire stérilement, sans introduction d'air, grâce à la surpression à l'intérieur de la bouteille. Le deuxième tube, placé d'une façon étanche au centre du bouchon, se trouve continuellement dans l'atmosphère de la bouteille et sert à l'évacuation du gaz. L'extrémité extérieure de ce tube porte une rallonge flexible terminée par une soupape de mercure.

Aussitôt après l'ensemencement, on paraffine les joints et remplace l'air de la bouteille par de l'azote (barbotage pendant deux heures à la vitesse de $300 \text{ cm}^3/\text{min.}$), puis on ferme le tube d'arrivée du gaz.

La quantité de milieu de culture est de trois litres par bouteille. Le dispositif utilisé permet d'effectuer simultanément deux cultures. Sauf mention spéciale, la température au cours de la culture est maintenue entre 24 et 26° .

2.4. TECHNIQUES DE MESURE DE LA QUANTITÉ DE MATIÈRE VIVANTE

La détermination de la quantité de matière vivante est nécessaire à la fois pour estimer la croissance des cultures et pour fournir une base de référence aux mesures des activités métaboliques ou enzymatiques.

Il ne saurait être question de discuter ici les techniques que l'on emploie généralement pour mesurer la croissance des populations de microorganismes. On trouvera dans les études consacrées spécialement à ce sujet (FAGUET, 1941 ; MONOD, 1942) les principes des différentes techniques. Au cours de ce travail, la croissance des cultures de levures, définie comme l'accroissement de la substance sèche de la population, a été mesurée par néphélométrie. Les expériences

préliminaires ont montré que, dans les conditions où nous opérons, l'opacité de la culture est proportionnelle à son poids sec déterminé directement (voir § 2.42). Dans certaines conditions expérimentales (voir §§ 3.23 ; 4.32 ; 4.4) il existe une dissociation entre la multiplication cellulaire, définie par l'accroissement du nombre d'individus dans la population, et la croissance. Nous avons donc suivi l'évolution des cultures à la fois par des mesures de leur croissance globale (néphélométrie, déterminations de l'azote total) et par des mesures de la multiplication cellulaire (numération des cellules).

La comparaison des activités métaboliques ou enzymatiques de plusieurs préparations nécessite une base de référence commune. On rapporte généralement ces activités à la quantité de « matière vivante » ou à la quantité de « matériel actif » que l'on définit arbitrairement, selon le problème posé. Les différents principes de l'estimation du « matériel actif » sont tout à fait analogues à ceux de l'estimation de la croissance et comportent des difficultés d'interprétation bien connues (cf. la discussion dans BERENBLUM et coll. 1939 ; BURRIS et WILSON, 1940).

Pour éviter autant que possible ces difficultés, la quantité de « matériel actif » est estimée dans ce travail par trois méthodes fondées sur des principes différents : numération de cellules vivantes, détermination du poids sec, détermination de l'azote cellulaire. Toutes ces manipulations sont effectuées sur des suspensions préparées d'une même façon : trois lavages par centrifugation (7 min. à 3.500 t.) à froid dans du tampon phosphate pH 4,6 et resuspension dans le même tampon.

2.41. *Numération des cellules*

Elle est effectuée à l'hématimètre (chambre de Lévy). On compte au moins 500 cellules réparties dans trois prises aliquotes. Les bourgeons non détachés dont la longueur dépasse un quart de la longueur de la cellule mère sont comptés comme des cellules indépendantes. La proportion de cellules mortes est déterminée par coloration au bleu de méthylène 1/4000 (cf. FINK, 1931). Dans presque toutes les expériences les cellules mortes représentent moins de 1/100 de la population totale, de sorte qu'il est inutile d'en tenir compte dans les calculs.

2.42. *Poids sec*

Le poids sec de la levure est déterminé soit directement, soit inféré à partir des données fournies par la néphélométrie.

Pour la *méthode pondérale*, une prise de la suspension cellulaire est lavée trois fois par centrifugation (10 min. à 3.500 t.) à froid

dans l'eau distillée. Le culot, repris par l'alcool éthylique à 95°, est transvasé quantitativement dans un vase à tarer et séché à 110° jusqu'à poids constant. Les pesées sont effectuées sur une balance sensible au 1/10 de mg. Dans le cas des préparations non cellulaires, le procédé est le même, à la centrifugation près.

Les mesures de la densité optique des suspensions de levures sont effectuées à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier. Les conditions de la mesure sont les suivantes : le diaphragme précédant la cuve est réglé une fois pour toutes à 2 mm ; on utilise l'écran jaune dont le maximum de transmission (61 %) est à 546 m μ et dont les limites de transmission (0 % et 0,4 %) sont à 509 m μ et 644 m μ respectivement ; on emploie une cuve rectangulaire à traversée horizontale de 1 cm d'épaisseur : la vitesse de sédimentation des cellules est trop faible pour gêner la mesure. Celle-ci est exprimée en divisions du tambour de l'électrophotomètre.

Pour que les données densimétriques aient une signification réelle, il faut vérifier :

- 1) que le nombre de divisions du tambour est proportionnel à la concentration de la suspension en cellules ;
- 2) que le rapport entre le nombre de divisions du tambour et le poids sec, déterminé pondéralement, ne varie pas au cours de la croissance.

Dans son étude de la croissance de certaines souches qui font également objet du présent travail, TAVLITZKI (1949) a montré (1) que la proportionnalité entre les unités arbitraires de l'opacité de la suspension et la concentration de celle-ci en cellules est réalisée entre 0 et 80 divisions, ce qui impose des dilutions lorsqu'il s'agit de mesurer des concentrations plus élevées, (2) que pour les souches B II, 59 R, 59 Rp et 59 RA, cultivées en milieu synthétique, la d. o. = 100 correspond à 50 mg p. s./litre et (3) que le rapport d. o./p. s. est constant au cours de la croissance. Nous avons étendu les résultats de TAVLITZKI à d'autres milieux, modes de culture et souches (tableau I).

On y voit que pour un groupe de souches (B II, 59 R, 59 Rp, 59 RA) le rapport d. o./p. s. est sensiblement le même quels que soient le milieu et les conditions de culture. Ils est donc permis de convertir les unités arbitraires de la d. o. en unités pondérales, ce qui sera fait en arrondissant partout la valeur du rapport d. o./p. s. à 0,50 mg/litre pour une d. o. = 100. Notons cependant que ce rapport n'est précis qu'à 10 % près. Pour d'autres souches, la correspondance entre les unités pondérales et densimétriques n'est plus

TABLEAU I

Relation entre densité optique et poids sec des suspensions de levure
(Pour les détails, voir § 2.42.)

Souche	Milieu et mode de culture	D. o. de la suspension	Poids sec de la suspension mg/cm ³	D. o. — 100 correspond à (mg p.s./l)
B II	N° 2, mode III, culture de 24 h.	935	10,1/20	54,0
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	1.386	14,8/20	53,4
	N° 1g, mode I, culture de 3 j.	2.475	26,1/20	52,8
59 R	N° 2, mode III, culture de 24 h.	903	9,05/20	50,1
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	1.208	14,0/20	57,9
	N° 1g, mode I, culture de 3 j.	1.407	14,5/20	51,5
59 RA	N° 2, mode III, culture de 24 h.	494	4,9/20	49,6
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	1.029	10,9/20	53,0
	N° 1g, mode I, culture de 3 j.	2.016	19,8/20	49,0
59 Rp	N° 2, mode III, culture de 24 h.	1.360	13,7/20	50,4
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	1.046	9,8/20	46,9
	N° 1g, mode I, culture de 3 j.	2.000	21,9/20	54,7
160	N° 2, mode III, culture de 24 h.	693	13,0/20	93,9
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	798	13,9/20	86,8
	N° 1g, mode I, culture de 3 j.	473	4,1/10	86,7
160 p	N° 2, mode III, culture de 24 h.	625	12,3/20	98,4
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	412	7,5/20	91,2
160 A	N° 2, mode III, culture de 24 h.	604	10,6/20	87,9
	N° 2, mode III, culture de 24 h.	625	11,7/20	93,6

la même, ce qui est dû vraisemblablement au fait qu'elles forment au cours de leur croissance de gros amas comportant plusieurs dizaines de cellules.

2.43. Azote

L'azote est dosé par la semi-microméthode de Kjeldahl. La prise contenant de 0,2 à 2,0 mg d'azote, est minéralisée par 1 cm³ de H₂SO₄ concentré, additionné de 0,5 g d'un mélange à parties égales de Cu SO₄ et K₂ SO₄. L'ammoniac distillé dans l'appareil de Parnas et Wagner après addition de 8 cm³ de NaOH à 30 %, est recueilli dans 5 cm³ de tampon borate dont la composition est :

Alcool éthylique à 95°	100 cm ³
Vert de Bromocrésol à 0,02 %	33 cm ³

Rouge de méthyle à 0,02 %	66 cm ³
Acide borique p. a.	5 g
Eau distillée	q. s. p. 500 cm ³

L'ammoniac recueilli est titré par HCl N/25. Le point de virage à pH 5 est repéré par comparaison avec la couleur de l'étalon en tampon citrate pH 5.

Les dosages sont effectués en double ; les différences entre deux prises du même échantillon ne dépassent pas 2 %. Les dosages d'une quantité connue de glycine ont donné 98,5 % de la valeur théorique.

2.5. TECHNIQUES MANOMÉTRIQUES

Les mesures manométriques sont effectuées selon la méthode de Warburg aujourd'hui classique (cf. DIXON, 1943 ; UMBREIT et coll., 1949). Nous ne donnerons donc que les précisions les plus importantes sur la technique de nos mesures.

Sauf mention spéciale le volume du liquide est de 3 cm³ par fiole et les mesures sont effectuées à 28° sur les cellules suspendues dans le KH₂PO₄ 0,067 M, pH 4,6. L'absorption du CO₂ est effectuée par 0,3 cm³ de KOH à 20 % ; pour en augmenter la surface, on introduit dans le compartiment central, contenant la potasse, un carré (1 cm × 1 cm) de papier filtre plié. L'agitation des manomètres est de 190-230 oscillations simples par minute, arc de 7 cm.

Les fioles et les manomètres sont jaugés avec du mercure à 0,02 cm³ près ; le volume total des fioles à un diverticule latéral est de 10 à 15 cm³, de celles à deux diverticules, de 18 à 21 cm³.

Le volume de CO₂ dégagé dans l'air est mesuré par la méthode directe de Warburg.

Dans les expériences où le pH du liquide est inférieur à 5, on ne fait pas de correction pour la rétention du CO₂ qui est négligeable.

L'anaérobiose est réalisée en faisant passer dans les fioles, pendant 30 minutes, un courant d'azote pur (voir § 2.2).

La durée maxima des expériences manométriques est de 5 heures. Des examens microscopiques ainsi que des étalements du contenu des fioles sur milieu nutritif ont montré que, dans les conditions de nos expériences, la contamination bactérienne est négligeable.

2.6. TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

1. Les positions des bandes d'absorption des solutions et suspensions sont déterminées à l'aide du spectroscope à réversion de Hartridge, monté sur un microscope. Le spectroscope a été étalonné avec la lampe fournie par la maison Beck de Londres :

Spectre d'émission étalon

5460,7 A
5852,5 A
6399 A

Positions trouvées

5460 A
5852 A
6401 A

Pour l'étude de préparations opaques telles que les suspensions cellulaires, la source lumineuse fournie avec cet instrument nous a paru insuffisante. Nous l'avons remplacée par une lampe plus puissante.

2. L'examen spectroscopique à basse température présente souvent de grands avantages : on sait que, dans ces conditions, le ϵ_M de plusieurs hémoprotéines est augmenté et que les positions des bandes d'absorption sont modifiées (KEILIN et HARPLEY, 1941 ; KEILIN et HARTREE, 1949). Les observations à basse température ont été effectuées en plongeant dans l'air ou l'azote liquide les préparations contenues dans des cuves en plexiglass d'épaisseurs variées (1 à 8 mm) et en les examinant aussitôt.

3. Le spectrophotomètre utilisé est celui de la maison Beckman, modèle DU. L'étalonnage du spectrophotomètre a été vérifié à 1 m μ près dans la région de 500-600 m μ , à l'aide de solutions de colorants à spectre d'absorption caractéristique.

Le cytochrome *c* en solution est dosé dans le tampon phosphate M/15, pH 7,3. Le calcul est fait en admettant $\epsilon_{mM} = 28,1$ à 550 m μ (UMBREIT et coll., 1949). Pour vérifier l'absence d'impuretés colorées, on détermine l'extinction de la même solution : *a*) après oxydation totale par le ferricyanure de K ($\epsilon_{mM} = 9,0$) et *b*) après réduction totale par l'hydrosulfite de soude ($\epsilon_{mM} = 28,1$). La concordance de ces déterminations prouve que l'absorption à 550 m μ est due uniquement au cytochrome *c*. Le protohémochromogène pyridinique en solution est dosé dans le milieu suivant : solution d'hématine 10 cm³, pyridine 3,3 cm³, KOH 0,1 N 3,3 cm³ (ELLIOT et KEILIN, 1934). Les mesures sont effectuées sur la solution réduite par l'hydrosulfite de Na immédiatement après la préparation. On calcule la teneur du protohémochromogène en admettant $\epsilon_{mM} = 31$ à 558 m μ (cf. LEMBERG et LEGGE, 1949).

4. Les dosages du cytochrome *c* et du protohémochromogène pyridinique dans les préparations opaques sont effectués selon ELLIOT et KEILIN (1934) à l'aide du microspectroscope de Leitz. Cette méthode consiste à compenser l'intensité de la bande α de la préparation en faisant varier l'épaisseur d'une solution étalon. Ceci est effectué après l'égalisation de l'opacité de fond qui résulte de la diffusion de la lumière par la suspension. Cette égalisation est obtenue

nue en intercalant, dans le faisceau lumineux dont l'intensité peut être variée et qui traverse la solution étalon, soit un verre dépoli, soit une préparation de levure chauffée et irréversiblement oxydée par H_2O_2 qui ne présente par conséquent aucune des bandes. Le cytochrome *c*, qui est thermostable, est dosé après chauffage de la suspension de levure pendant 20 minutes à 80° . Le protohémochromogène pyridinique (bande α à 557-8 m μ) est dosé dans le mélange :

Suspension de levures à 50 % (v/v)	1 cm ³
Pyridine	0,33 cm ³
KOH 0,1 N	0,33 cm ³
Hydrosulfite de Na	qqs mg

Etant donnée la présence d'une forte bande *c* dans les spectres de quelques-unes de nos préparations d'hémochromogène pyridinique, nous avons, pour le dosage de ce dernier, apporté à la méthode de ELLIOT et KEILIN (*l. c.*) la modification suivante. Le cytochrome *c* est dosé sur une partie aliquote chauffée de la même préparation. Pendant la compensation de l'intensité de la bande α de l'hémochromogène pyridinique, la cuve étalon contenant le cytochrome *c* (cuve en coin avec une contre-cuve en coin contenant le solvant) est laissée en place et dans une position correspondant à la teneur de la préparation en cytochrome *c*. Il en résulte que les valeurs obtenues pour le protohème sont exclusives du groupement prosthétique du cytochrome *c*.

La méthode décrite présente l'avantage d'être applicable à l'étude de préparations opaques et ne nécessite donc pas l'extraction des pigments. Son défaut est la précision relativement faible des mesures. Dans les conditions de nos déterminations, les dosages sont précis à 10 % près. La validité des valeurs absolues fournies par cette méthode repose sur l'hypothèse que les coefficients d'extinction des pigments *in situ* et en solution sont identiques (¹). Les valeurs relatives en sont au contraire indépendantes.

5. La vitesse de réduction du cytochrome *c* est mesurée spectrophotométriquement dans des cuves de 1 cm de trajectoire contenant 3 cm³ de liquide. Pour éviter la réoxydation du cytochrome *c* par la cytochrome oxydase, on ajoute du KCN 0,003 M immédiatement avant l'addition du substrat. Les mesures de l'extinction à 550 m μ sont effectuées toutes les 30 ou 60 secondes contre un blanc contenant tous les réactifs sauf le substrat.

Les variations de la température au cours de la mesure ne dépass-

(¹) Les résultats récents de CHANCE (1952) indiquent qu'il en est ainsi.

sent pas 1°. Toutefois les différences de température d'une mesure à l'autre peuvent atteindre 4°.

2.7. TECHNIQUES DIVERSES

1. Les mesures du pH sont effectuées à l'aide des pH mètres Gamma ou Radiometer munis d'électrodes de verre.

2. La majorité des centrifugations est effectuée dans la centrifugeuse refroidie (« International Equipment Co. ») dont les caractéristiques principales sont :

3.500 tours/minute = 2.400 G au fond du tube,
18.000 tours/minute = 25.000 G au fond du tube.

3. Le « jus de Lebedeff » est préparé de la façon suivante : la levure est lavée dans l'eau distillée et centrifugée ; le culot est étalé sur du papier filtre et séché à 25° pendant deux jours ; la levure sèche est pulvérisée, suspendue dans trois volumes d'eau distillée et autolysée à 37° pendant cinq heures. On centrifuge 20 minutes à 3.500 tours, et siphonne le liquide surnageant. On additionne au culot le même volume d'eau et on répète la centrifugation. Les deux liquides surnageants sont réunis et amenés à un volume connu. La dialyse est effectuée comme pour le broyat (§ 2.71).

4. La vitesse de décoloration du bleu de méthylène est mesurée à 28°, selon la technique de Thunberg (cf. UMBREIT et coll., 1949). Après avoir établi le vide dans le tube de Thunberg, à l'aide d'une pompe à huile, on le remplit d'azote. La manipulation est répétée deux fois. Après l'équilibration thermique de 6 minutes, on déclanche la réaction en mélangeant l'enzyme avec le reste du système. Le temps de décoloration de 90 % est mesuré (on utilise pour la comparaison un tube standard non évacué qui contient tous les réactifs et 1/10 du BM). Les différences entre les dosages en double n'excèdent pas 5 %. Sauf mention spéciale le volume de liquide est de 3,5 cm³ par tube.

2.71. Préparation du « broyat »

Nous décrirons en détail la préparation du « broyat » de levures et son fractionnement car cette préparation enzymatique a été utilisée très fréquemment au cours du présent travail ⁽¹⁾.

La levure est lavée trois fois par centrifugation (7 min. à 3.500 t.)

(1) Cette technique de préparation diffère légèrement de celle décrite précédemment par SLONIMSKI et EPHRUSSI (1949).

dans le tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,3). Après la dernière centrifugation, on suspend le culot dans approximativement son volume du même tampon : ceci constitue la « *suspension 50 % (v/v)* ». N cm³ de cette suspension (en général 5 à 25 cm³) sont mis dans un flacon bouché à l'émeri d'une capacité de 100 cm³. On y ajoute des billes de verre (diamètre 0,05 à 0,15 mm) en quantité telle que le niveau du liquide dépasse de 3 à 4 mm celui des billes de verre. Le flacon est ensuite agité pendant une heure à l'aide d'un agitateur ultra-rapide (J. W. Towers et Co.). Pendant l'agitation, le flacon est refroidi par un jet continu de chlorure d'éthylène. Pour reprendre quantitativement le contenu, on lave les billes de verre plusieurs fois avec des petites quantités de tampon ; les fractions sont réunies et amenées à un volume = 2,5 N. Après centrifugation (10 min. à 3.500 t.), la préparation présente trois couches distinctes (1) le liquide surnageant, gris-brun trouble, (2) une couche épaisse blanche, composée de parois et de débris cellulaires et (3) une couche très mince brunâtre, constituée par des cellules intactes. Les comptages à l'hématimètre, ainsi que les étalements en boîtes Petri, ont montré que le traitement employé désintègre au moins 95 % des cellules. Le liquide surnageant (1) est ensuite prélevé de façon à ne pas entraîner la couche intermédiaire, et recentrifugé pendant 10 minutes à 3.500 tours. On obtient alors le liquide surnageant (2) fortement opalescent et un très mince culot blanc qui correspond à la couche intermédiaire de la centrifugation précédente. Le liquide surnageant (2) est siphonné et constitue le « *broyat* ».

Le « *broyat* » est totalement dépourvu de cellules intactes ou de parois cellulaires. L'examen microscopique montre la présence de nombreux granules de quelques dixièmes de μ de diamètre. Il contient, comme le montre le tableau II, environ 50 % de l'azote des cellules intactes.

Le « *broyat* » ainsi obtenu peut être utilisé tel quel ou dialysé ou fractionné par centrifugation. La dialyse est effectuée dans des tubes en cellulose « *Visking* » de 2 cm de diamètre, contre 1 litre de tampon phosphate, pH 7,3 ; 0,02 M pendant 15 à 20 heures, en changeant deux fois le tampon.

Le fractionnement du « *broyat* » est effectué par une centrifugation de 60 minutes à 18.000 tours (= 25.000 G). Après avoir siphonné le liquide surnageant fortement opalescent, le culot brun-rouge d'aspect gélatineux est remis en suspension dans un très petit volume du tampon par écrasement contre les parois du tube à l'aide d'un agitateur. L'homogénéisation du culot est obtenue en le fai-

TABLEAU II

Répartition de l'azote entre les cellules intactes et le broyat dialysé
(Pour les détails, voir § 2.71.)

Expé- rience	Souche	Suspens. de cellules intactes				Broyat dialysé			
		Volume en cm ³	Mg N/ cm ³	Mg N	% N	Volume en cm ³	Mg N/ cm ³	Mg N	% N
D 1	59 R ae	20,0	10,0	200,0	100	43,5	1,90	82,6	41,3
D 2	59 R ae	14,0	11,0	154,0	100	33,5	2,11	70,6	45,9
D 3	59 R ae	14,0	10,74	150,5	100	34,5	1,93	66,5	44,1
D 9	59 R ae	15,0	8,18	122,8	100	34,5	1,68	57,9	47,4
D 11	59 R ae	6,0	7,52	45,1	100	16,7	1,46	24,4	54,0
D 29	59 R ae	10,5	7,18	75,4	100	22,5	2,48	55,8	74,0
D 5	59 RA ae	6,5	9,40	61,1	100	18,5	1,80	33,4	54,6
D 10	59 RA ae	10,0	10,45	104,5	100	25,5	2,07	52,8	50,5
D 12	59 RA ae	4,45	8,65	38,5	100	12,8	1,45	18,6	48,2
D 28	59 RA ae	7,0	7,95	55,7	100	13,5	2,54	34,3	61,6
D 4	59 R an	20,0	10,98	219,6	100	55,0	2,13	117	53,4
D 7	59 R an	7,0	13,83	96,8	100	20,0	2,76	55,2	57,0
D 8	59 R an	10,0	14,9	149	100	25,5	2,90	74,0	49,6
D 7	59 R ad	10,0	9,71	97,1	100	25,0	2,36	59,0	60,8
D 8	59 R ad	10,0	9,01	90,1	100	26,0	2,01	52,3	58,0

sant passer plusieurs fois par un tube capillaire (diamètre env. 50 μ); cette suspension est ensuite amenée à un volume connu et constitue la « *fraction G* ». Le liquide surnageant, amené au volume initial du broyat, constitue la « *fraction S* ».

Toutes les manipulations, depuis la séparation de la levure de son milieu de culture jusqu'au test enzymatique, sont effectuées à froid (0-4°).

2.72. Dosage du Fer

Les dosages du Fer organique sont effectués selon une méthode que nous avons mise au point nous fondant sur les travaux de HILL (1930), THORP (1941) et PAPPENHEIMER (1947) et qui repose sur la formation d'un complexe coloré entre le $\alpha\alpha$ -dipyridyl et le Fe^{++} minéral, mais non avec le Fer héminique. La courbe de correspondance entre la concentration du sel de Mohr et l'extinction, déterminée au préalable, est linéaire entre $E_{524} = 0,04$ et 0,8 ; le maximum d'absorption du complexe se trouve à 522-6 $m\mu$ et son $\epsilon_{mM}(\text{Fe})$ est égal à 8,4 à 524 $m\mu$. Le procédé suivant a été adopté. Une suspension de levure lavée à l'eau bidistillée est divisée en deux parties : l'une (a) est minéralisée directement ; sur l'autre (b), on titre le Fe inorganique et, après l'extraction du Fe minéral, on miné-

ralise le résidu obtenu, ce qui permet de doser le Fe organique (c). La précision des dosages est inférée de la concordance des valeurs de Fe total obtenues directement (a) avec la somme (b) + (c) (v. tableau III), ainsi que de la récupération quantitative (93 %) du Fer minéral ajouté.

TABLEAU III

Dosage du Fe total, inorganique et organique chez la levure de boulangerie du commerce.

	(a) γ Fe total	(b) γ Fe inorganique		(c) γ Fe organique		$a - (b + c)$ a
		(b ₁) extraction à l'alcool	(b ₂) extraction au SO ₂	(c ₁) résidu minéralisé après extraction à l'alcool	(c ₂) résidu minéralisé après extraction au SO ₂	
Par prise de 10 cc de la suspension	30,0	22,6	22,0	11,1	10,5	- 9,7 %
	29,9 29,8	21,5 20,4	23,7 25,3	10,6 10,0	9,9 9,35	
Par mg N cellulaire	0,721	0,545		0,246		

Dosage du Fe inorganique : 1) prise non minéralisée + 1 cc αα-dipirydyd 0,025 M + 30 mg hydrosulfite de Na + 2 cc tampon acétate 2 M + 5 cc alcool à 96° ; 2) prise comme 1) + 1 cc αα-dipirydyd 0,025 M + 30 mg hydrosulfite de Na + 5 cc tampon acétate 2 M + SO₂ passage pendant 2 min. + 1 cc NaOH 15 % (p./v.). 1) et 2) abandonnés pendant 2 h., centrifugés 7 min. 3.500 t., les culots sont lavés deux fois avec eau bidistillée et minéralisés ensuite. Les liquides surnageants sont réunis, amenés à 50,0 cc avec eau bidistillée et dosés spectrophotométriquement.

Minéralisation : Dans un ballon de Kjeldahl : prise + 0,3 cc H₂SO₄ conc. + 3 × 10 cc HNO₃ conc. + 2 cc H₂O₂ 100 v. ; durée 8 h.

Dosage spectrophotométrique : contre le blanc correspondant contenant tous les réactifs ; prise minéralisée + 6 cc tampon acétate 2 M + 1 cc NaOH 15 % (p./v.) + 1 cc αα dipirydyd 0,025 M + 30 mg hydrosulfite de Na + eau bidistillée ad. 10 cc ; pH final : 4,2 - 5,0.

2.8. ABRÉVIATIONS

Les abréviations suivantes seront utilisées au cours de cet exposé :
Données manométriques.

On exprimera les valeurs manométriques selon le principe :

Q atmosphère
gaz étudié (base de référence).

L'atmosphère et la base de référence ne sont pas mentionnées quand l'atmosphère est l'air, et lorsqu'on adopte, comme base de

référence, le mg de poids sec (UMBREIT et coll., 1949). Par ex. :
 Q_{O_2} : nombre de mm^3 d'oxygène absorbés pendant 1 heure par mg p. s. de la préparation dans l'air.

Q_{CO_2} : nombre de mm^3 de CO_2 dégagés pendant 1 heure par mg p. s. de la préparation dans l'air.

$Q_{O_2}(N)$ et $Q_{CO_2}(N)$: comme les deux valeurs précédentes, mais exprimés par mg d'azote de la préparation.

Q_{CO_2} fermentation ; $Q_{CO_2}(N)$ fermentation ; $Q_{CO_2}(\text{cellule})$ fermentation : expriment le nombre de mm^3 de CO_2 dégagés par fermentation dans l'air. $Q_{CO_2} \text{ fermentation} = Q_{CO_2} - Q_{O_2}$.

QR : quotient respiratoire = rapport du volume de CO_2 dégagé au volume d'oxygène absorbé.

Données spectroscopiques.

On exprimera les valeurs spectroscopiques selon le principe :

$$E = \frac{\text{épaisseur de la couche}}{\text{longueur d'onde}}$$

E : extinction = $\log_{10} I_0/I$ où I_0 — intensité de la lumière incidente,

I — intensité de la lumière transmise.

$E_{402}^{1\text{ cm}}$: extinction produite à 402 $m\mu$ après traversée d'une couche de 1 cm d'épaisseur.

$E_{402}^{1\text{ cm}}$ (porphyrine) : extinction, due aux porphyrines, produite à 402 $m\mu$ après traversée d'une couche de 1 cm d'épaisseur.

ϵ_M : coefficient molaire d'extinction E/cl

où c = concentration molaire,

l = épaisseur de la couche = 1 cm.

ϵ_{mM} : coefficient millimolaire d'extinction.

Données relatives aux activités déshydrogénasiques.

On exprimera les activités selon le principe :

$$Q = \frac{\text{donateur}}{\text{accepteur}} \quad (\text{base de référence}).$$

Accepteur bleu de méthylène.

$t_{0,9}$: temps (en minutes) nécessaire à réduire 90 % du bleu de méthylène dans les conditions du test.

Q_{BM} : mesure l'activité de la préparation enzymatique dans les con-

ditions du test. Il est exprimé en mm^3 de bleu de méthylène réduit par heure et par 1 cm^3 de préparation enzymatique.

$$Q_{\text{BM}} = \frac{60 \times 0,9 \times C_{\text{BM}} \times 22,4}{t_{0,9} \times V_e}$$

où C_{BM} = quantité de bleu de méthylène en micromoles,

V_e = volume de la préparation enzymatique en cm^3 .

Etant donné qu'une molécule de BM réduit correspond à une molécule d' H_2 transporté, le Q_{BM} exprime en même temps le nombre de mm^3 d' H_2 enlevé au substrat par heure et par cm^3 de préparation enzymatique.

$Q_{\text{BM}}(\text{N})$: mesure la *pureté* de la préparation enzymatique et est exprimé en mm^3 de bleu de méthylène réduit par heure et par mg d'azote, de la préparation.

$$Q_{\text{BM}}(\text{N}) = \frac{Q_{\text{BM}}}{\text{mg N/cm}^3}$$

R_{BM} et $R_{\text{BM}}(\text{N})$: mesurent le rendement total de l'activité enzymatique rapporté à la quantité de cellules intactes au départ. L'introduction de ces constantes, non utilisées généralement par les biochimistes, est justifiée dans le texte (p. 82). Elles décrivent l'*efficacité* du procédé employé pour extraire et pour tester l'enzyme, et donnent ainsi une idée de l'importance que peut avoir dans le métabolisme de la cellule intacte cette réaction enzymatique.

$$R_{\text{BM}} = \frac{Q_{\text{BM}} \times V_p}{P_s} \quad R_{\text{BM}}(\text{N}) = \frac{Q_{\text{BM}} \times V_p}{A_s}$$

où V_p = volume total de la préparation enzymatique obtenue en cm^3 ,

P_s = quantité de cellules intactes en mg p. s. utilisée pour préparer V_p ,

A_s = quantité de cellules intactes en mg d'azote utilisée pour préparer V_p .

Accepteur cytochrome c.

Toutes les notations affectant les divers quotients sont analogues à celles définies ci-dessus. L'activité est calculée à partir du temps de la demi-réduction du cytochrome *c*. Etant donné qu'une molécule de cytochrome *c* réduit correspond à un atome d'H transporté, le nombre de mm^3 d' H_2 enlevé au substrat est égal à $Q_{\text{cyt. c/2}}$.

* * *

d.o. : opacité de la suspension de levure, exprimée en divisions du tambour de l'électrophotomètre (voir § 2.42).

p.s. : poids sec.

p.h. : poids humide.

3. RÔLE D'UN FACTEUR HÉRÉDITAIRE DANS LA FORMATION DES ENZYMES : ÉTUDE COMPARÉE DE LA MUTATION « PETITE COLONIE »

3.1. INTRODUCTION

Comme il a été indiqué dans la Préface, ce chapitre est consacré à l'étude comparée des levures normales et des levures chez lesquelles le type « petite colonie » résulte d'une mutation cytoplasmique. EPHRUSSI et ses collaborateurs (1949) ont montré que la plupart des populations de levures, même celles d'origine monosporique ou monocellulaire, sont hétérogènes : étalées sur un milieu complet, elles forment des colonies qui appartiennent à deux classes différant par leur taille. Des « petites colonies » se rencontrent avec une fréquence de l'ordre de 1 % dans les cultures normales de plusieurs espèces. Le traitement par l'acriflavine conduit rapidement au remplacement total dans la population des cellules normales par les cellules mutées. Cette transformation est stable, et les lignées issues des colonies « petites » présentent des caractéristiques des colonies qui sont stables au cours de milliers de générations cellulaires.

Dans ce chapitre, nous allons essayer de répondre à la question : quelles sont les différences physiologiques entre les levures normales et mutées ⁽¹⁾ ? Les problèmes corollaires seront : les différences observées permettent-elles de rendre compte du phénotype des levures « petites », décrit par EPHRUSSI et coll. (*l. c.*) ? les lignées qui possèdent les mêmes caractéristiques des colonies, mais diffèrent par leur origine (mutation spontanée, mutation induite par l'acriflavine, « petites » provenant des diverses races de levures) sont-elles physiologiquement identiques ? enfin, quels renseignements peut-on tirer de l'étude physiologique quant à la nature du processus assurant la transmission héréditaire du type normal et au mécanisme de la mutation ?

Un premier pas vers la solution de ces problèmes a été fait par TAVLITZKI (1949) qui a comparé la croissance de quelques souches normales et mutantes. Il a pu montrer que, dans un milieu aéré où

⁽¹⁾ Il ressort de ce qui a été dit plus haut qu'une population cellulaire de levures « normales » contient toujours environ 1 % de cellules mutées. Dans le travail biochimiques, on ne tiendra pas compte de cette hétérogénéité, car la précision des mesures est généralement inférieure à 1 %.

le sucre est le facteur limitant, les « grandes » prolifèrent plus vite que les mutants, et que le rendement en matière vivante des premières est quatre fois plus grand que celui des dernières. Ses constatations suggèrent que les deux types de levures diffèrent par le mode d'utilisation du sucre. Nous avons donc commencé notre étude par des recherches sur le métabolisme des glucides. L'exposé qui va suivre sera divisé en trois parties. Dans la première on trouvera la description du métabolisme tel qu'il apparaît à la suite d'expériences effectuées à l'aide de techniques manométriques et portant sur des cellules non proliférantes. La seconde partie, où il sera question des systèmes enzymatiques responsables de la respiration et de la fermentation, permettra de mieux définir les différences trouvées entre les deux races de levure. Dans la Discussion, on cherchera à intégrer les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail avec ceux fournis par l'étude génétique.

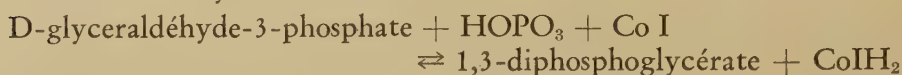
Avant d'aborder le sujet proprement dit de ce chapitre, il est peut-être utile de rappeler brièvement les traits essentiels du métabolisme glucidique de la levure ⁽¹⁾.

Métabolisme glucidique de la levure.

La levure est capable de métaboliser le glucose avec ou sans intervention de l'oxygène libre. Dans le premier cas, on parle de respiration, dans le second de fermentation. Le bilan global du *catabolisme anaérobie* est décrit par l'équation de GAY-LUSSAC : $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$, $\Delta_{F_0} \cong - 50 \text{ kg cal}$. Le mécanisme de cette réaction a été élucidé surtout par les travaux de MEYERHOF, EMBDEN, PARNAS, WARBURG, NEEDHAM, LIPMANN, NEUBERG, FERNBACH et SCHOEN. Parmi toutes les réactions dont la levure est le siège, celles qui suivent cette voie sont les mieux connues et il est probable que le schéma proposé décrit assez fidèlement l'enchaînement des processus au sein de la cellule vivante. La molécule de glucose, en C_6 , est scindée au cours d'au moins douze étapes successives qui aboutissent à la formation de deux molécules d'acide pyruvique. Ce dédoublement est accompagné de l'estérification du phosphate minéral. Le caractère catalytique de la phosphorylation ressort du fait que le phosphate est absent des produits initiaux et finaux de la réaction. Les deux étapes-clefs de la fermentation

(1) Il ne saurait être question de donner ici une revue complète des travaux, même les plus importants, relatifs à ce sujet. Le métabolisme des hydrates de carbone est traité dans tous les manuels de chimie biologique et on en trouvera une description détaillée dans de très nombreuses mises au point dont les plus récentes sont celles de LIPMANN, 1942 ; DORFMAN, 1943 ; BARRON, 1943 ; KREBS, 1943 ; POLONOVSKI, 1944 ; STOTZ, 1945 ; LARDY, 1949 ; DICKENS, 1951.

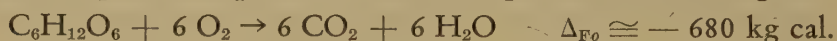
alcoolique sont les deux oxydoréductions : la première opère au niveau du 3-phosphoglyceraldéhyde qui réagit avec l'acide phosphorique pour donner le diester ; celui-ci, à son tour, est deshydrogéné par le coenzyme I oxydé, sous l'influence de l'enzyme triosephosphate-deshydrogénase ; la deuxième est la réaction finale, où l'aldéhyde acétique, provenant de la décarboxylation directe de l'acide pyruvique, est hydrogéné par l'alcool-deshydrogénase aux dépens du même coenzyme réduit.



La première oxydoréduction est couplée avec la formation d'une molécule d'acide adénylpyrophorique (ATP) à partir d'acide adénylique (ADP). L'ATP est l'instrument universel des échanges de l'énergie libérée par les oxydations. Le nombre de molécules d'ATP formées mesure l'efficacité du processus dans la génération de l'énergie directement utilisable par la cellule. Il y en a deux par résidu en C_3 , la deuxième molécule provenant du transfert de l'énergie emmagasinée dans la liaison riche de l'acide phosphoenolpyruvique. Il en résulte que, pour une molécule de glucose fermenté, quatre molécules d'ATP sont synthétisées et, comme deux d'entre elles sont utilisées pour les phosphorylations initiales des hexoses ($\text{glucose} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{glucose-1-phosphate} + \text{ADP}$; $\text{fructose-6-phosphate} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{fructose-1-6-phosphate} + \text{ADP}$), on a le droit d'écrire le bilan global du catabolisme anaérobie sous la forme :

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{ADP} + 3 \text{H PO}_3 \rightarrow 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{ATP}$$

La *respiration* du glucose est beaucoup plus complexe et nos connaissances de son mécanisme intermédiaire sont très fragmentaires par comparaison avec celles de la fermentation. Elle est caractérisée par la diversité des voies possibles qui s'offrent à la molécule du sucre et qui toutes peuvent rendre compte de la réaction globale :



Le glucose peut d'abord être dégradé selon la voie apotomique de WARBURG et CHRISTIAN, DICKENS, où l'hexosemonophosphate de ROBISON est oxydé en acide phosphohexonique qui, à son tour, est oxydé et décarboxylé en acide phosphopentonique et ainsi de suite, jusqu'à la formation d'un résidu en C_3 . La deuxième voie suit la voie fermentaire décrite plus haut jusqu'au stade acide pyruvique qui constitue une « plaque tournante » vers laquelle convergent la plupart des réactions du métabolisme des glucides, lipides et protéines. Le coenzyme réduit formé par l'oxydation du triosephos-

phate est oxydé par le système WARBURG-KEILIN. Le pyruvate entre dans plusieurs réactions qui aboutissent à son oxydation complète à l'aide des cycles (de SZENT-GYÖRGI, KREBS, THUNBERG, WIELAND, KNOOP et autres) des acides organiques en C_4 ou C_5 . Ces acides jouent le rôle de catalyseurs de la respiration cellulaire en s'intercalant dans le transport d'hydrogène entre le substrat glucidique initial et les médiateurs finaux qui réagissent avec l'oxygène atmosphérique. L'énergie de la combustion complète du sucre est ainsi libérée graduellement, par des séries d'oxydoréductions, toutes couplées avec des phosphorylations. Le couplage consiste dans la formation, aux dépens d'une déshydrogénation, des liaisons « riches en énergie » qui peuvent être transférées sans perte à l'ADP, formant ainsi l'ATP. Le nombre de molécules d'ATP synthétisées aux dépens de la respiration d'une molécule de sucre est de l'ordre de 20 à 30, ce qui montre la supériorité très nette du processus oxybiotique.

Les mécanismes des *processus anaboliques* aérobie ou anaérobie sont encore peu connus. Toutes les réactions de la voie MEYERHOF-EMBDEN-PARNAS étant réversibles, la synthèse du glycogène peut s'effectuer théoriquement à partir de n'importe quel produit de la chaîne de dégradation. Il en est de même pour la voie respiratoire. La direction du métabolisme global est vraisemblablement déterminée par le rapport ADP/ATP qui varie selon les besoins énergétiques de la cellule. Lorsque ce rapport augmente, la dégradation s'accélère, quand il diminue, c'est au contraire la direction anabolique qui prend le dessus. Cependant, il paraît de plus en plus certain que, dans les conditions physiologiques, certaines transformations empruntent dans les deux directions, des voies différentes et s'opèrent grâce à des enzymes distincts. Les recherches récentes sur la mobilité métabolique du gaz carbonique en fournissent un exemple : depuis les travaux de WOOD et WERKMAN, on ne considère plus le CO_2 comme un produit inerte du catabolisme, mais comme un métabolite qui est continuellement repris par des réactions qui régissent l'équilibre dynamique de la cellule.

3.2. MÉTABOLISME DES CELLULES INTACTES

3.21. Métabolisme du glucose

On sait que l'importance que l'on peut attacher aux résultats obtenus à l'aide des méthodes manométriques dépend, en grande partie, des conditions de l'expérience manométrique elle-même (cf. UMBREIT et coll., 1949). Il nous a donc fallu effectuer un certain nombre d'expériences préliminaires afin de nous assurer de la validité

des conclusions qui en seront tirées. Une description sommaire de ces expériences est donnée ci-dessous.

1. La relation entre la vitesse des échanges gazeux et la quantité de cellules a été mesurée dans l'intervalle de 0,1 à 3 mg ps de levure par fiole. Comme le montre la figure 1 cette relation est linéaire aussi bien pour la fermentation que pour la respiration, et les courbes passent par l'origine des coordonnées. Il est donc évident que la diffusion des gaz (CO_2 ou O_2) n'est pas le facteur limitant la vitesse des échanges gazeux dans les conditions où nous opérons.

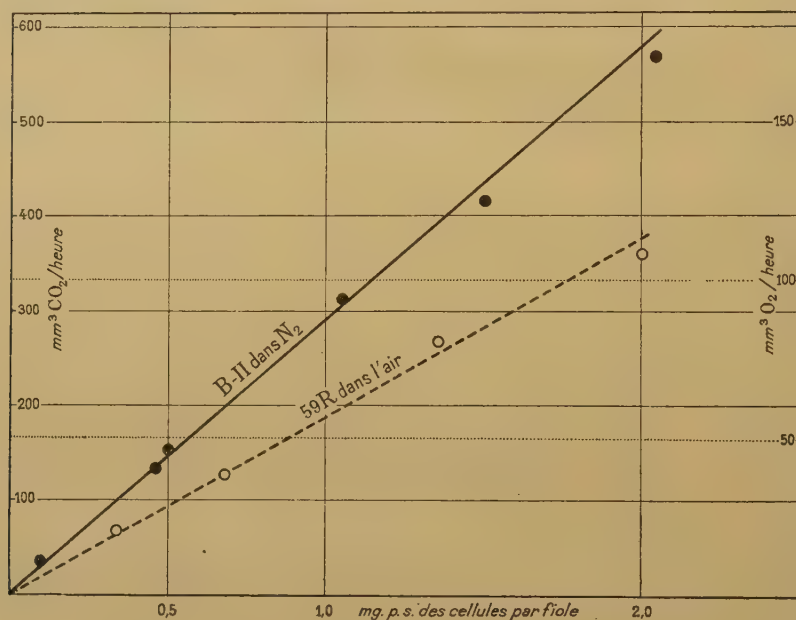


Fig. 1. — Vitesses de la respiration et de la fermentation anaérobie en fonction de la quantité de cellules.

La première lecture est faite 15 min. après l'addition du glucose (4 %). Chaque point représente la moyenne de deux déterminations. Cultures de 48 h. dans le milieu 2, mode III.

2. La relation entre l'activité métabolique et la quantité de glucose a été étudiée. Cette étude avait pour but de nous renseigner, d'une part, sur les concentrations du substrat en présence desquelles les cellules montrent une activité maxima et, d'autre part, sur les conditions où l'arrêt des échanges gazeux est dû à l'épuisement du sucre. Un exemple est donné par la figure 2. On y voit que la vitesse maxima de la fermentation anaérobie est atteinte quand la concentration du glucose est de 1 à 4 %. Entre les concentrations de 0,02

à 0,1 %, la vitesse initiale du dégagement du CO_2 est proportionnelle à la concentration initiale du sucre ; la concentration du glucose nécessaire à la demi-saturation du système fermentaire des cellules intactes est de 8×10^{-3} M à 28° et à pH 4,6. Les résultats de cette expérience sont tout à fait semblables à ceux

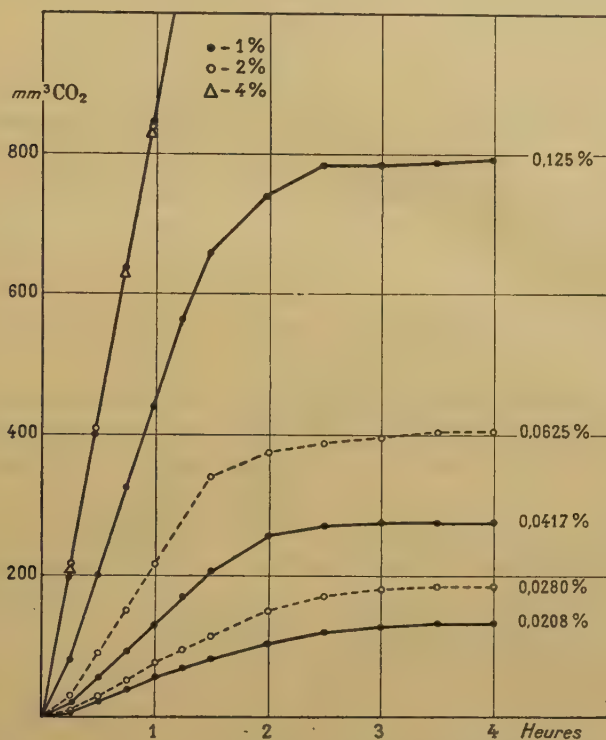


Fig. 2. — Dégagement du CO_2 en présence des différentes concentrations du glucose par la souche B II dans l'azote.

Par fiole : 2,74 mg ps d'une levure cultivée pendant 48 h. dans le milieu 2, mode III. Chaque point représente la moyenne de deux déterminations.

obtenus par HOPKINS et ROBERTS (1935). Ces auteurs, travaillant sur une levure de brasserie basse, ont trouvé que, dans les faibles concentrations de sucre, la vitesse de fermentation est proportionnelle à la concentration initiale du substrat ; la concentration de la demi-saturation était de 11×10^{-3} M à 30° ⁽¹⁾. La figure 2 permet

(1) Notons que SLEIN et coll. (1950) ont déterminé la constante de dissociation du complexe glucose-hexokinase (premier enzyme dans la chaîne de dégradation du glucose) à l'aide de l'enzyme cristallisé à partir de la levure, et ont trouvé la valeur de 1,3 à $1,6 \times 10^{-4}$ M.

de constater en outre que l'arrêt de l'activité mesurable est déterminé par la quantité du substrat exogène. En effet, si on porte en abscisse la quantité de glucose présent au départ (de 3 à 20 μ moles) et en ordonnée le volume du CO_2 dégagé, on obtient une droite qui passe par l'origine des coordonnées. Notons cependant que le volume du CO_2 dégagé est inférieur au volume théorique, requis par la formule classique de la fermentation alcoolique : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Ce déficit du gaz carbonique, qui est de $13 \pm 3 \%$, n'est pas dû à la rétention par le tampon phosphate, ni à l'utilisation incomplète du sucre. A la lumière des travaux récents (VAN NIEL et ANDERSON, 1941 ; CLIFTON, 1946 ; BUCHANAN et LIENER, 1951) il est vraisemblable qu'il est dû soit à ce qu'une fraction constante du CO_2 dégagé est reprise pour les synthèses, soit à ce qu'une partie du glucose est assimilée directement, au lieu d'être fermentée.

Des expériences analogues, portant sur la fermentation anaérobie, la fermentation aérobie et la respiration, ont été effectuées avec des souches « grandes » et « petites ». Leurs résultats étaient parallèles à ceux discutés plus haut. Chez les souches normales, la vitesse maxima de la respiration est constante quand la concentration du glucose est de 0,5 à 4 %. Remarquons cependant que, dans le cas des mesures de la respiration des levures « petites », les propriétés particulières de ces souches rendent impossible une étude précise de la relation entre la respiration et la concentration du glucose à l'aide de la technique manométrique habituelle. Ce problème sera discuté p. 33.

3.211. FERMENTATION ANAÉROBIE

Le tableau IV donne les résultats d'un groupe d'expériences portant sur la fermentation anaérobie de trois souches « grandes » et de trois « petites ». Les cellules proviennent de cultures du type III de vingt-quatre heures dans le milieu naturel 2. On voit que les six souches fermentent le glucose de la même façon, leurs $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ étant sensiblement égaux.

Des expériences analogues ont été réalisées avec d'autres souches « grandes » et « petites », et avec des levures cultivées dans le milieu synthétique liquide 4, et sur le milieu naturel solide 1g. Elles ont toutes fourni le même résultat : la fermentation anaérobie des souches comparées *ne présente pas de différences significatives*. Notons cependant que la fermentation anaérobie des levures « grandes » cultivées en boîtes de Petri semble être légèrement inférieure ($Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2} = 210$ env.) à celles des levures

TABLEAU IV

Fermentation du glucose à 4 % dans une atmosphère d'azote
(Pour les détails, voir § 3.211.)

Souche de levure	Poids sec de levure par fiole (en mg)	CO ₂ dégagé en 60 minutes (en mm ³)	Q _{CO₂} ^{N₂}
B II	1,51	416	276
	0,445	131	287
	1,06	312	295
59 R	0,245	66	270
	0,947	264	278
	0,993	250	253
59 RA	0,306	86	281
	0,876	267	307
	0,594	182	305
59 Rp	0,328	79	240
	0,117	30	284
	1,31	405	310
160	1,24	376	303
	1,05	316	301
160 p	1,48	455	307
	1,12	370	331

« petites » cultivées dans les mêmes conditions, ainsi qu'à celle des souches « grandes » ayant proliféré en milieu liquide ($Q_{CO_2}^{N_2} \cong 280$). Il nous paraît pourtant prématuré d'attacher une importance spéciale à ces faibles différences. En effet, des variations de l'intensité fermentaire anaérobie de l'ordre de $\pm 18\%$ (c'est-à-dire $Q_{CO_2}^{N_2} = 220-320$) ont constamment été observées entre levures cultivées dans différentes conditions. Elles ne sont pas dues à l'imprécision des mesures manométriques, mais soit à des facteurs déterminant la vitesse du métabolisme anaérobie du glucose qui échappent à notre contrôle, soit à des variations du dénominateur (p.s.) du quotient métabolique.

3.212. RESPIRATION ET FERMENTATION AÉROBIE

Le tableau V donne les résultats d'un groupe d'expériences portant sur la respiration et la fermentation aérobie des cultures du type III de 48 heures dans du milieu 2. Les chiffres mettent en évidence des différences très nettes entre les souches normales et

TABLEAU V

Respiration et fermentation aérobie en présence de glucose à 4 %
(Pour les détails, voir § 3.212.)

Souche	Poids sec de levure par fiole (en mg)	O ₂ absorbé en 60 min. en absence de substrat (en mm ³)	O ₂ absorbé en 60 min. en présence de glucose (en mm ³)	CO ₂ dégagé en 60 min. en présence de glucose	Q _{O₂} endogène	Q _{O₂} glucose	Q _{CO₂} fermentation
B II	0,826	17	30	166	21	36	165
	0,701	12	28	145	17	40	167
	1,11	31	68	232	28	61	149
59 R	0,317	4	10	57	13	32	148
	0,371	9	26	73	24	51	127
	0,683	12	38	144	18	55	156
59 RA	0,328	0,5	1	80	1,5	3	241
	0,594	0	4	156	0	7	256
	1,81	1,5	4	502	1	2	275
59 Rp	0,380	1	3	92	2	9	232
	1,31	0	6	327	0	5	243
	1,52	2	7	432	1	5	280
160	1,24	22	56	195	18	45	112
	1,05	21	43	174	20	41	125
160 p	1,48	2	4	435	1,3	2,5	290
	1,12	1	3	353	1	2,7	312

mutantes. Les cellules normales présentent une forte respiration endogène ; chez les mutants celle-ci est pratiquement nulle. En présence de sucre, les « grandes » absorbent beaucoup plus d'oxygène que les « petites ». D'autre part, la fermentation des « grandes » est nettement inhibée par l'oxygène (le Q_{CO_2} fermentation ne représente que 50 à 60 % du $Q_{CO_2}^{N_2}$), tandis que celle des « petites » n'est pas influencée de façon appréciable (le Q_{CO_2} ferm. représente 95 % du $Q_{CO_2}^{N_2}$ en moyenne). Les valeurs du Q_{O_2} des « grandes » montrent cependant des différences considérables d'une expérience à l'autre, sans qu'une confusion soit cependant possible entre les deux types cellulaires. Les causes de cette variabilité du Q_{O_2} des « grandes » apparaîtront au chapitre 4, mais le tableau VI permet dès maintenant de constater qu'elle est limitée aux cultures insuffisamment aérées (¹). En effet, lorsque la prolifération a eu lieu dans un milieu constamment aéré (boîtes de Petri, tubes à barbotage ou bouteille tournante), l'intensité respiratoire des cultures se fixe à 82 ± 10 , tandis que la multiplication dans des fioles d'Erlemmayer agitées sporadiquement (mode de culture III) a pour effet une diminution du pouvoir respiratoire, accompagnée d'une plus grande variabilité du Q_{O_2} , égal à 48 ± 29 .

La faible respiration des « petites » en présence de sucre ne peut pas être déterminée avec autant de précision que celle des « grandes ». L'erreur absolue d'une mesure manométrique est de 1 à 2 mm³. Afin d'obtenir une précision de 10 %, il faudrait mesurer la consommation d'oxygène d'une suspension de « petites » contenant 5 à 10 mg ps par fiole. Or, dans ces conditions, la quantité de CO₂ dégagée est tellement grande (1500-3000 mm³ par heure) que son absorption par la potasse est incomplète et les résultats des mesures sont aussi imprécis qu'auparavant. Il est cependant possible, en traitant statistiquement les résultats de l'ensemble des mesures, d'arriver à une estimation valable. C'est ainsi que la moyenne de plus de 100 déterminations de la respiration des « petites » a fourni une valeur du $Q_{O_2} = 3,4$. Cette respiration résiduelle, contrairement à ce que l'on observe chez la levure normale n'est apparemment pas influencée par le mode de culture employé.

3.213. UTILISATION D'UNE QUANTITÉ LIMITANTE DE GLUCOSE

Les expériences préliminaires décrites plus haut ont montré que, mises en présence d'une quantité limitante de glucose (0,5 cm³ d'une

(¹) Il est à noter que SWANSON et CLIFTON (1948) et AUBERT et coll. (1952) ont trouvé qu'au début de leur croissance les levures métabolisent le sucre par fermentation bien que se trouvant en aérobiose.

TABLEAU VI

Comparaison du métabolisme aérobie du glucose chez les souches 59 R et 59 RA.

Conditions de culture		59 R		59 RA	
milieu	mode	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ferment.	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ferment.
N° 2	III, cultures de 48 h.	32	148	3	241
N° 2	III, cultures de 48 h.	71	127	7	256
N° 2	III, cultures de 48 h.	55	156	2	275
N° 2	III, cultures de 48 h.	39	162	0	302
N° 1g	I, cultures de 3 j.	85	11	2	216
N° 1g	I, cultures de 3 j.	77	17	0	243
N° 1g	I, cultures de 3 j.	85	13	1	262
N° 1g	I, cultures de 3 j.	75	18	0	221
N° 1g	I, cultures de 3 j.	86	13	7	246
N° 1g	I, cultures de 2 j.	85	72	0	280
N° 1g	I, cultures de 2 j.	87	54	3	293
N° 1g	I, cultures de 2 j.	74	14	—	—
N° 3	VI, cultures de 28 h.	89	58	0	301
N° 3	VI, cultures de 24 h.	68	81	2	328
N° 4	IV, cultures de 21 h.	94	38	—	—
N° 4	IV, cultures de 37 h.	100	29	0	205
N° 5	IV, cultures de 27 h.	86	32	3	258

solution 0,01 M = 5 μ moles, par exemple) les cellules épuisent le sucre en quelques heures. Les données manométriques permettent ainsi une étude quantitative des vitesses relatives des processus de respiration et de fermentation, et du bilan total de l'utilisation du sucre. Il est à noter que le calcul de ces diverses grandeurs repose sur les formules classiques de la respiration et de la fermentation. La valeur des renseignements obtenus est ainsi subordonnée à la validité de ces formules.

Le tableau VII et la figure 3 donnent les résultats d'expériences de ce genre. On voit qu'en présence d'oxygène les « petites » utilisent le substrat presque exclusivement en le fermentant, et qu'elles l'épuisent aussi vite qu'en anaérobiose, c'est-à-dire en une à deux heures. Les cellules normales, au contraire, abstraction faite d'une faible fermentation au début de l'expérience, utilisent le sucre par

TABLEAU VII

Utilisation de 5 μ moles de glucose par les souches 59 R et 59 RA.

Heures	dans l'air					dans l'azote	
	O ₂ absorbé (mm ³)	substrat respiré %	CO ₂ dégagé (mm ³)	substrat fermenté %	QR	CO ₂ dégagé (mm ³)	substrat fermenté %
59 R							
1	81	12	105	11	1,30	139	62
2	182	27	204	10	1,12	160	72
3	277	41	299	10	1,08	183	82
4	344	51	364	9	1,06	188	84
5	370	55	385	7	1,04	192	86
Bilan total au bout de 5 h.		55 7	par respiration par fermentation			— 86	
		62				86	
59 RA							
1	7	1	153	68	22	162	72
2	12	2	166	74	14	179	80
3	17	3	188	84	11	188	89
4	20	3	188	84	9,4	199	89
5	23	3	186	83	8,1	197	88
Bilan total au bout de 5 h.		3 83	par respiration par fermentation			— 88	
		86				88	

Par fiole : 2 mg (p. s.) de levures cultivées pendant 3 j., milieu 1 g, mode I.

respiration ⁽¹⁾ et, en conséquence, l'épuisent beaucoup plus lentement : au bout de cinq heures, la consommation n'est pas encore

(1) Le calcul de la fraction respirée du substrat est fait sans soustraction préalable de l'intensité respiratoire endogène que l'on peut mesurer séparément, car il est difficile d'affirmer que cette dernière s'effectue avec la même intensité en présence du sucre qu'en son absence (cf. VAN NIEL, 1943). S'il en est ainsi, comme l'indiquent les derniers travaux de REINER et coll. (1949), notre calcul surestime la fraction respirée du glucose. Nous avons pris soin de travailler avec des suspensions cellulaires « inanitiées », c'est-à-dire ne présentant qu'une respiration endogène faible (QO_2 endogène = 5 — 10 pendant la première heure pour les « grandes »), de sorte que la surestimation peut être, tout au plus, de 20 % de la valeur calculée au bout de 5 h. Etant donnée l'absence de fermentation endogène, le CO₂ fermentaire provient entièrement du substrat extérieur.

terminée. Le quotient respiratoire des « grandes » subit au cours de l'expérience des variations importantes : de l'ordre de 1,5 à 2 au départ, il tend ensuite vers l'unité, valeur qu'il atteint vers la troisième heure. Chez les « petites », le QR est, dès le début de l'expérience, extrêmement élevé. Sa valeur, comprise selon l'expérience entre 20 et ∞ , ne peut être déterminée qu'avec peu de précision, en raison de la faiblesse de la respiration.

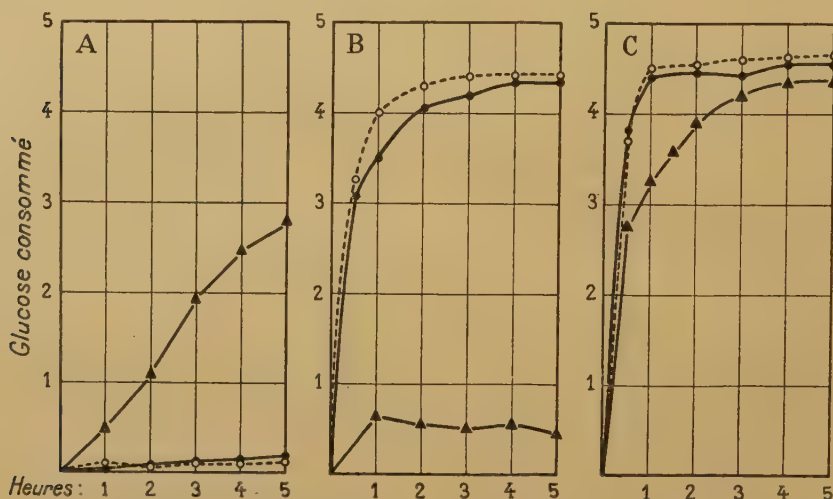


Fig. 3. — Utilisation de 5 micromoles de glucose.

A, utilisation par respiration dans l'air, B et C utilisation par fermentation, dans l'air et dans l'azote respectivement.

Souches : 59 R (triangles), 59 RA (points) et 59 Rp (cercles).
 Par fiole : 2 mg ps de levure cultivée pendant 3 j., milieu 1g, mode I.

L'évolution de la fermentation aérobie des « grandes » est assez particulière (fig. 3 ; tableau VII). L'addition du substrat est suivie d'un brusque dégagement du CO_2 fermentaire, dont le volume, non seulement n'augmente pas au cours des mesures ultérieures, mais au contraire diminue graduellement. N'ayant pas cherché à approfondir l'étude de ce phénomène, nous ne pouvons proposer qu'une interprétation bien hypothétique et nous n'en parlons ici que parce que cette observation peut se rattacher au problème particulièrement intéressant de la localisation intracellulaire des enzymes. Le milieu intracellulaire est hétérogène. Le dégagement initial de CO_2 pourrait donc résulter d'une plus grande accessibilité du système fermentaire comparée à celle du système respiratoire. Cette plus grande accessibilité pourrait être due, par exemple, à la localisation périphérique des enzymes ou bien à ce que les enzymes du système

EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS se trouvent dans la phase continue du cytoplasme tandis que ceux de la respiration sont souvent liés à la fraction corpusculaire (cf. § 3.36). Les expériences de plusieurs auteurs suggèrent la possibilité d'un tel mécanisme : MYRBÄCK et VASSEUR (1943) ont mis en évidence le rôle actif joué par la paroi cellulaire des levures dans la fermentation du lactose ; ROTHSTEIN et MEIER (1948) ont montré que de nombreuses phosphatases sont liées à la paroi cellulaire, BARRON et coll. (1950) pensent que les enzymes de la dismutation de l'acide pyruvique sont localisés à la périphérie de la cellule des levures ; enfin LEIBOWITZ et HESTRIN (1945) ont passé en revue plusieurs cas « d'inaccessibilité » des enzymes de la levure pour leurs substrats.

Dans les expériences résumées dans le tableau VII et dans la figure 3, les échanges gazeux ne rendent pas compte de la totalité du glucose initialement présent dans le milieu. En aérobiose, les « petites » se comportent comme les autres souches en absence d'air et le déficit de CO_2 est de 10 à 15 % ; les levures normales présentent un déficit plus grand qui, en aérobiose, est de l'ordre de 30 %. Cette différence entre les deux races s'explique par l'intensité plus grande de l'assimilation oxydative comparée à l'assimilation anaérobie (cf. CLIFTON, 1946).

3.214. COMPARAISON DES DIFFÉRENTES SOUCHES GRANDES ET PETITES ; IDENTITÉ DES MUTATIONS INDÉPENDANTES ; PERMANENCE DU CARACTÈRE MUTANT.

EPHRUSSI et coll. (1949) ont trouvé que les mutants « petite colonie » apparaissent spontanément ou peuvent être induits par l'acriflavine dans la plupart des races de levure étudiées. Nous avons trouvé que toutes les « petites » examinées, dont une partie est donnée par la liste page 5, possèdent les mêmes propriétés métaboliques fondamentales, quelles que soient leur origine, les caractéristiques de leurs colonies ou leurs exigences nutritives.

Les expériences précédentes ont toutes porté sur une seule lignée de « petites acriflavinées » (59 RA), c'est-à-dire, dérivée d'une colonie apparue à la suite du traitement par l'acriflavine de la souche normale 59 R. Or, on pouvait se demander si toutes les colonies de taille réduite qui se forment lorsque la souche 59 R est étalée sur un milieu acriflaviné solide et qui correspondent, par conséquent, à des mutations indépendantes représentent bien la même mutation. Nous avons donc prélevé au hasard six petites colonies dans une expérience de ce genre pour constituer six lignées mutantes indépendantes. Les déterminations résumées dans le tableau VIII ont été faites sur ces six lignées. Ces souches, on le voit, présentent des caractéristiques identiques à celles de la souche 59 RA.

TABLEAU VIII

Utilisation aérobie de 5 μ moles de glucose (en % du substrat) par six lignées (A_1 - A_6) isolées de la souche 59 R à la suite du traitement par l'acriflavine.

Temps en minutes	A_1		A_2		A_3		A_4		A_5		A_6	
	respiré	fermenté	respiré	fermenté	respiré	fermenté	respiré	fermenté	respiré	fermenté	respiré	fermenté
15	0	78	0	74	0	76	0	75	0	71	0	71
30	0	90	0	92	0	88	0	79	0	84	0,5	81
45	0	90	0	95	0	89	0	84	0	86	1	81
60	1	91	0,5	96	0	89	0	84	0,5	85	1,5	81
120	1,5	91	1	96	0	91	0,5	83	1	96	2	80

Par fiole : 5 mg (p. s.) de levures cultivées pendant 5 j. ; milieu 1g ; mode I.

EPHRUSSI et coll. (1949) ont montré par la mesure de la croissance des colonies que le caractère « petite colonie » se maintient au cours de très nombreux passages. Il ressort du tableau IX que cette constatation trouve une confirmation dans les déterminations manométriques : on y voit, en effet, que les « petites » récemment isolées et n'ayant pas subi de passages, aussi bien que la souche 59 RA, vieille de 320 passages, n'utilisent le glucose que par voie fermentaire. Comme on verra plus loin (§ 4.2), les propriétés métaboliques sont un critère beaucoup plus sûr que les caractéristiques des colonies ou de croissance qui peuvent changer considérablement au cours

TABLEAU IX

Utilisation aérobie de 5 μ moles de glucose (en % de substrat) par la souche 59 RA ayant subi 320 passages et par une « petite acriflavinée » récemment isolée.

Temps en minutes	59 RA (320 passages)		59 RA' (0 passage)	
	respiré	fermenté	respiré	fermenté
15	0	70	0	78
30	1	74	0	84
45	1	81	0	85
60	2	83	1	85
120	2	82	1	85

Par fiole : 5 mg (p. s.) de levures cultivées pendant 5 j. ; milieu 1g, mode I.

des passages. Au cours de cinq années d'observations, nous n'avons jamais constaté de retour à la forme normale parmi de nombreuses souches « petites » sur lesquelles nous avons travaillé. Etant donné que les « grandes » possèdent un avantage sélectif considérable (EPHRUSSI et coll. 1949), tout porte à croire que la mutation est irréversible.

3.22. Métabolisme de quelques sources de carbone

Etant données les différences profondes qui existent dans l'utilisation aérobie du glucose par les « grandes » et par les « petites », il nous a paru intéressant de comparer la respiration de quelques substrats en C_2 , C_3 et C_4 . Ces corps, qui font partie, selon toute vraisemblance, des métabolites intermédiaires des hydrates de carbone, pouvaient nous renseigner sur le « point d'attaque » de la mutation. Si l'un d'eux était respiré par le mutant avec la même intensité que par la souche normale, on pourrait penser que la mutation provoque une suppression d'une des réactions de la dégradation respiratoire du glucose précédant la formation du corps en question. Si, au contraire, la souche « petite » n'était capable de respirer aucun des substrats essayés, on serait tenté de supposer qu'une réaction commune à l'oxydation de tous ces corps est bloquée.

TABLEAU X

Comparaison du métabolisme aérobie de divers substrats en C_2 — C_4 par les souches 59 R et 59 RA.

Exp.	Substrat	59 R			59 RA		
		Q _{O₂}	Q _{CO₂}	Q R	Q _{O₂}	Q _{CO₂}	Q R
E ₇	—	12	11	0,95	0,2	0,3	1 env.
	Ethanol 0,1 M	95	31	0,32	2,7	2,3	1 env.
	Ethanol 1 M	91	32	0,34	2,8	2,8	1 env.
E ₁₁	—	7,5	8	1,05	0,3	0,4	1 env.
	Ac. acétique 0,01 M	82	80	0,97	1,0	1,2	1 env.
	Ac. acétique 0,05 M	83	82	0,99	1,8	2,1	1 env.
E ₁₄	—	12			0,65		
	Ac. lactique 0,05 M	44			1,1		
	Ac. pyruvique 0,05 M	36			2,8		
	Ac. succinique 0,05 M	11			1,3		
	Ac. malique 0,05 M	10			1,4		
	Ac. fumarique 0,05 M	10			1,3		

Levures cultivées pendant 3 j. dans le milieu lg., mode I et « inanitiées » par aération dans le tampon.

Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau X. Il en ressort clairement qu'*aucun des substrats ne permet une respiration dont l'intensité est analogue à celle des « grandes »*. Tous provoquent une stimulation par rapport à la respiration endogène ($Q_{O_2} = 0,3$ à $0,6$), mais on n'arrive jamais à dépasser la limite du $Q_{O_2} = 3$, valeur de la respiration des « petites » en présence de glucose. Les effets de la mutation doivent donc être localisés plutôt dans la partie « terminale » de la respiration cellulaire, commune à la dégradation de tous les corps expérimentés.

Outre la différence quantitative habituelle entre les deux races, la respiration de l'éthanol montre une différence qualitative. Les « grandes » l'utilisent avec un $QR = 0,30-0,35$ (comme dans les expériences de MEYERHOF, 1925, sur la levure de boulangerie), tandis que le QR des « petites » est de l'ordre de 1. Le mécanisme et les produits des oxydations doivent donc différer dans les deux

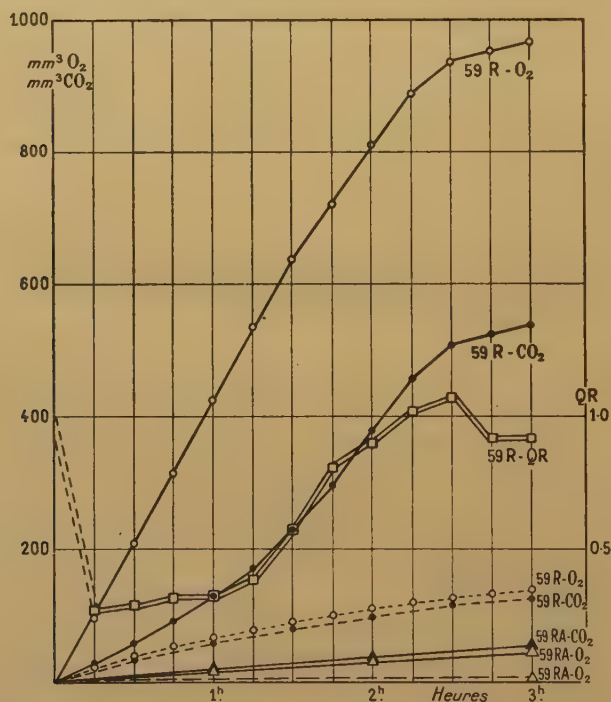


Fig. 4. — *Respiration des souches 59 R et 59 RA en présence d'alcool (20,7 micromoles).*

Par fiole : 5,5 mg ps de levure cultivée pendant 3 j. dans le milieu 1g, mode I. Trait plein : en présence d'alcool. Trait pointillé : en absence d'alcool.

cas. Il faut noter que chez les « grandes » on trouve un $QR = 0,3$ seulement en présence d'un excès d'alcool. Quand la concentration initiale d'alcool est faible (0,007 M, par exemple), on constate un accroissement continu du QR, qui à la fin de l'expérience approche l'unité (fig. 4). Tout se passe donc comme si l'alcool était transformé en un produit intermédiaire qui est ensuite respiré avec un $QR = 1$. Le travail de NOVELLI et LIPMANN (1950) indique que l'alcool est transformé en acétate (cf. aussi MARTIUS et LYNEN, 1950) qui s'accumule chez la levure carencée en coenzyme A, incapable d'effectuer la réaction suivante, c'est-à-dire la synthèse du citrate à partir de l'acétate.

On sait que l'intensité du métabolisme des acides pyruvique, lactique, succinique et malique de la levure dépend de facteurs affectant la perméabilité cellulaire (SMYTHE, 1938 ; LYNEN, 1943 ; BARRON et coll., 1950). BARRON et coll. (*l. c.*) suggèrent que la paroi cellulaire n'est perméable que pour les molécules non dissociées de ces acides, de sorte que la respiration maxima peut être obtenue seulement à des pH très bas (2 à 3), où le substrat se trouve sous forme non ionisée. Il n'est donc pas étonnant que les valeurs du Q_{O_2} consignées dans le tableau X, obtenues à pH 4-5, soient inférieures au Q_{O_2} en présence de glucose, d'alcool ou d'acétate ($Q_{O_2} = 80-90$). Notons enfin que l'addition des acides succinique, malique ou fumarique n'augmente pas la consommation d' O_2 par rapport à l'intensité endogène chez les « grandes », tandis que chez le mutant elle a un faible effet stimulant. Il semble probable que ce manque d'accélération de la respiration chez les « grandes » est dû à une mauvaise pénétration des acides, car le « broyat » de « grandes » oxyde quantitativement le succinate (v. § 3.33) et contient une puissante deshydrogénase malique (§ 3.354).

3.23. Métabolisme endogène

STIER et STANNARD (1936, 1937) ont montré que la dégradation des réserves endogènes de la levure (*S. cerevisiae*) est un processus purement respiratoire, les cellules intactes ne fermentant pas le substrat endogène, ni dans l'azote, ni dans l'air. Selon les mêmes auteurs, l'action du cyanure et de l'acide monoiodoacétique sur la respiration endogène indique que c'est le même système respiratoire qui intervient dans l'utilisation oxydative des substrats endogènes et exogènes. Ces résultats ont été confirmés par SPIEGELMAN et NOZAWA (1945) qui les ont étendus à d'autres espèces de levures. D'autre part, STIER et ses collaborateurs (STIER, 1939 ; STIER et SPRINCE, 1941 ; STIER et coll., 1939), dans une série de travaux

consacrés à la formation des réserves endogènes, ont montré que les vitesses relatives d'accumulation du glycogène et des lipides diffèrent selon les conditions expérimentales : aérobiose ou anaérobiose, état physiologique des cellules, composition du milieu.

On a déjà vu (tableau V) que la respiration endogène des « petites » est extrêmement faible, tandis que celle des « grandes » est de l'ordre généralement trouvé chez les levures de boulangerie (cf. MEYERHOF, 1925 ; SPIEGELMAN et NOZAWA, 1945). Le graphique de la figure 5 permet de voir les variations du taux de la respiration endogène des souches B II, 59 R, 59 RA et 59 Rp en fonction du temps. En accord avec les auteurs cités plus haut, on observe que la diminution avec le temps du Q_{O_2} end. des souches normales obéit à une cinétique d'une réaction enzymatique. La vitesse de la respiration endogène est d'abord constante et diminue ensuite exponentiellement. A partir de ce moment l'intensité respiratoire semble être proportionnelle à la concentration du substrat endocellulaire qui, dans ce cas, est vraisemblablement le glycogène.

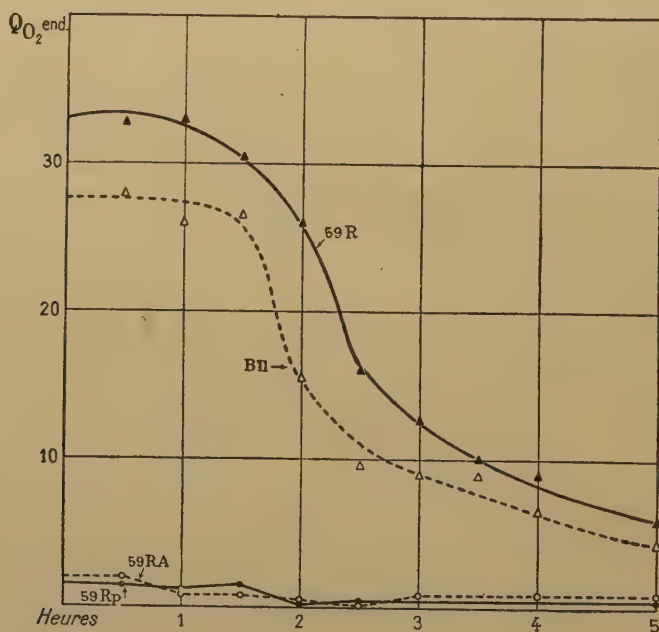


Fig. 5. — Vitesse de la respiration endogène en fonction du temps.

Levures cultivées pendant 24 h. dans le milieu 2, mode III. Durée de la mise en route (depuis le moment où les cellules sont séparées du milieu nutritif jusqu'à la première lecture), 60 min. à 0-4°.

L'intensité de la respiration endogène dépend donc de deux facteurs : quantité de substrat disponible et quantité d'enzymes qui le catabolisent (STIER, 1939). Il était intéressant de comparer la respiration endogène des levures qui, tout en gardant inchangée leur intensité catabolique maxima (mesurée par le Q_{O_2} en présence d'un excès de glucose), diffèrent par la teneur en réserves. Si on pouvait trouver des conditions dans lesquelles le Q_{C_2} endogène des « grandes » est augmenté, le comportement de la souche mutée dans les mêmes conditions pourrait nous indiquer si la faiblesse de sa respiration endogène est due à la non-formation de réserves endogènes ou à leur dégradation plus lente. L'expérience a consisté dans la comparaison de la respiration des levures d'abord inanitiées, puis cultivées dans des conditions variées. Afin de les inanitier, les levures 59 R et 59 RA ont été placés pendant 24 heures dans des tubes contenant du tampon KH_2PO_4 M/15 stérile et traversés par un courant d'air. Leur respiration endogène étant déterminée, 2 cm³ de la suspension (0,2 mg ps) de chacune des souches furentensemencés dans des tubes à barbotage contenant 50 cm³ du milieu 3, dont la teneur en sucre était soit de 0,15 %, soit de 4,0 %. La croissance a été suivie par néphélométrie. Les échantillons destinés aux déterminations manométriques de la respiration endogène ont été prélevés pendant la phase exponentielle de la croissance et après l'arrêt de celle-ci. Avant d'être introduits dans les fioles de Warburg, ils ont été lavés suivant la technique habituelle. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau XI. On constate qu'à la suite du séjour dans

TABLEAU XI

Influence des conditions de culture sur la respiration endogène.
(Pour les détails, voir § 3.23.)

Temps (minutes)	Q_{O_2} endogène des cellules « inanitiées »		Q_{O_2} endogène des cellules ayant proliféré en présence de							
			glucose à 0,15 %				glucose à 4 %			
			Pendant la croissance		Après l'arrêt de la croissance		Pendant la croissance		Après l'arrêt de la croissance	
			59 R	59 RA	59 R	59 RA	59 R	59 RA	59 R	59 RA
30	5,6	0,6	18,4	1,1	11,8	0,9	28,0	1,5	14,6	0,5
60	5,0	0,2	15,3	1,4	11,0	0,3	27,0	0,5	12,1	1,3
90	5,5	0,9	10,6	0,2	8,0	0,5	17,1	1,2	—	—

le milieu contenant le substrat, la respiration endogène des « grandes » a nettement augmenté et que son maximum se trouve dans la phase de croissance exponentielle. La valeur maxima de la respiration endogène dépend de la concentration en sucre au cours de la croissance et croît avec celle-ci. Après l'arrêt de la croissance de la culture, le substrat endogène est respiré plus lentement, et les variations de la respiration endogène en fonction de la concentration du sucre sont moins prononcées. Etant donné que la respiration de toutes ces levures en présence d'un excès de substrat exogène (4 % de glucose) était sensiblement la même ($Q_{O_2} = 78-91$), nous pouvons conclure que les variations du taux de la respiration endogène résultent des différences dans la quantité des réserves. Dans les mêmes conditions, la respiration endogène des « petites » ne varie pas au delà des erreurs expérimentales, de sorte qu'il est impossible, en se fondant uniquement sur cette expérience, de conclure quant à la cause de leur faible Q_{O_2} endogène.

Les observations suivantes permettent de répondre affirmativement à la question de savoir si les mutants sont capables de former les réserves endogènes.

Lorsqu'on place une suspension de 59 RA, préalablement « inani-tiée », dans du tampon phosphate glucosé à 4 %, l'opacité, proportionnelle au poids sec, de la suspension augmente considérablement. Les comptages à l'hématimètre révèlent qu'il n'y a pas d'accroissement notable du nombre des cellules. Il en résulte que le poids d'une cellule individuelle s'accroît et peut, en quelques heures, atteindre jusqu'à 150 % de la valeur initiale. Dans ces conditions, le liquide de Lugol colore en brun les cellules de 59 RA ; c'est la coloration caractéristique du glycogène. La levure traitée de la même façon en absence de glucose, présente un rapport *poids sec / nombre des cellules* constant. Travaillant dans des conditions analogues, STIER et coll. (1939), ont montré que l'accroissement de l'opacité est parallèle à l'augmentation de la teneur en glycogène et en lipides.

On se souvient que les bilans manométriques de l'utilisation du glucose montrent toujours un déficit de 10 % environ. Tout porte à croire que ce déficit de sucre ou de CO_2 est dû à l'assimilation avec accumulation de réserves. En ce qui concerne l'étendue de cette assimilation et la nature des produits formés, seuls les dosages chimiques directs pourraient nous renseigner. Il nous semble néanmoins démontré que la faible respiration endogène des « petites » est due à la rupture du catabolisme commun à la dégradation des glucides exogènes et endogènes et non à la rupture de leur anabolisme.

3.24. *Action des inhibiteurs*

Les progrès récents de nos connaissances du métabolisme intermédiaire sont, pour une grande part, dus à l'emploi d'inhibiteurs « spécifiques ». On entend par inhibiteur spécifique idéal une substance qui paralyse un ferment unique dans un système intégré de plusieurs enzymes. De tels inhibiteurs sont extrêmement rares et la majorité des corps utilisés appartiennent au groupe d'inhibiteurs que KREBS (1943) préfère nommer « sélectifs », c'est-à-dire ayant une spécificité étroite, quoique non absolue. Sans vouloir nous engager dans une étude détaillée de l'action des divers inhibiteurs sur la dégradation des sucres par la levure, il nous a paru intéressant de comparer le comportement des deux formes, « grandes » et « petites », vis-à-vis de trois substances à actions « sélectives » complémentaires : l'acide monoiodoacétique, le fluorure de Na et le cyanure de K. L'emploi du seul inhibiteur « spécifique » du catabolisme glucidique, à savoir de l'acide malonique (QUASTEL et WOOLDRIDGE, 1928) n'a pas été pour nous d'un grand secours, car cet acide pénètre difficilement dans la cellule de levure et il est souvent difficile d'interpréter son action sur le métabolisme des cellules intactes (cf. AUBEL et SZULMAJSTER, 1950).

Les expériences sur l'action des inhibiteurs ont été entreprises pour voir :

1) Si l'inhibition de la fermentation des « petites » conduit à l'augmentation de leur respiration. En effet, on a vu plus haut que les différences entre « grandes » et « petites » concernent la respiration, la fermentation étant apparemment identique chez les deux formes. Or, on pouvait se demander si la déficience respiratoire des mutants était due au blocage du système respiratoire ou, au contraire, résultait d'un pouvoir fermentaire accru au point de n'être pas complètement aboli en présence d'oxygène. Si le dernier mécanisme était en jeu, l'inhibition sélective de la fermentation devrait restaurer la respiration. Un cas analogue, mais opérant en sens inverse, est connu : l'inhibition de la respiration des « grandes » par le KCN fait apparaître une très forte fermentation aérobie.

2) Si la fermentation aérobie des deux races emprunte le même mécanisme. Un inhibiteur sélectif permet en principe d'isoler, parmi une multitude de réactions, une réaction particulière. Si la réaction sensible à la substance toxique est commune à la dégradation des glucides par les deux souches, on pourrait s'attendre à ce que l'allure de l'inhibition soit la même chez les « grandes » et chez les « petites ». Si, au contraire, l'expérience révélait des différences dans l'inhibi-

tion, l'interprétation la plus simple serait que la réaction inhibée est différente d'une levure à l'autre.

Un problème analogue se pose à propos de la respiration des deux races.

3.241. ACIDE MONOiodoacétique (MIA)

Le MIA appartient au groupe d'inhibiteurs qui agissent en se combinant avec les radicaux -SH des enzymes. RAPKINE (1933) et DICKENS (1933) ont montré que le MIA réagit stoechiométriquement avec les substances contenant des groupements -SH (tel le glutathion), et que son action peut être représentée par la formule



La fermentation ou la glycolyse peut, d'après LUNDGAARD (1930), être inhibée sélectivement par le MIA 10^{-3} M, sans que la respiration soit touchée. Plusieurs auteurs, parmi lesquels PICKETT et CLIFTON (1943 *a*), ont plus récemment conclu de leurs propres expériences, ainsi que de l'examen des chiffres de LUNDGAARD (*l. c.*), que le MIA inhibe également la respiration, quoiqu'à un degré beaucoup moindre et plus variable, selon les conditions, que la fermentation. De nombreux enzymes peuvent être inhibés par le MIA (cf. BERSIN, 1935, 1940 ; BARRON et SINGER, 1945) ; les plus sensibles sont apparemment l'alcool-déshydrogénase (inhibition complète par MIA 3×10^{-4} M, DIXON, 1940), la triosephosphate-déshydrogénase (RAPKINE, 1938 ; STILL, 1940) et la déshydrogénase succinique (HOPKINS et coll., 1938). L'action du MIA sur la fermentation serait due au blocage de la réaction couplée entre les triosephosphates et l'aldéhyde acétique, par inhibition de la triosephosphate-déshydrogénase.

Le tableau XII résume les résultats d'une expérience destinée à montrer si l'inhibition de la fermentation des « petites » conduit à l'augmentation de leur respiration. On voit que, parmi les concentrations de MIA utilisées, certaines inhibent totalement la fermentation aérobie des « grandes », sans que leur respiration soit affectée dans la même mesure : la concentration de $0,17 \times 10^{-4}$ M, par exemple, réduit la fermentation à 7 % de sa valeur normale, alors que la respiration n'est diminuée que de 40 %. En accord avec les auteurs cités plus haut (LUNDGAARD, 1930 ; PICKETT et CLIFTON, 1943 *a*), on constate que la fermentation des « grandes » est plus sensible que leur respiration. La souche mutante se comporte tout autrement. La gamme des concentrations de MIA utilisée provoque une inhibition de la fermentation, allant de 20 à 98,5 %. La respiration des « petites » ne subit cependant pas de variation dépassant

TABLEAU XII

Influence de la concentration du monoiodoacétate de sodium sur la respiration et la fermentation aérobie des souches 59 R et 59 RA.

59 R		Concentration du monoiodoacétate $M \times 10^{-4}$	59 RA	
Q_{CO_2} ferm.	Q_{O_2}		Q_{CO_2} ferm.	Q_{O_2}
101	78	0	297	7
7	46	0,17	—	—
6	40	0,20	—	—
5	35	0,22	—	—
4	30	0,27	237	5
2	20	0,53	155	3
—	—	0,66	97	1
0	13	1,05	39	7
—	—	1,28	17	5
—	—	1,8	5	2

Par fiole : 2 mg ps de levure cultivée pendant 2 j., milieu 1 g, mode I. MIA neutralisé est ajouté 1 h. avant l'addition du sucre. Les valeurs sont calculées d'après le nombre de mm^3 de gaz dégagé ou absorbé pendant les premières 60 min. de contact avec le glucose à 4 %.

la valeur des erreurs expérimentales. Il ne paraît donc pas possible de restaurer la respiration des « petites » en inhibant leur fermentation.

L'examen du tableau XII et de la figure 6 montre que la fermentation aérobie des cellules mutantes est bien plus résistante au MIA que celle des cellules normales. En effet, la concentration de l'inhibiteur qui réduit l'intensité fermentaire des « grandes » à 4 %, par exemple, n'inhibe que peu (20 %) la valeur du Q_{O_2} ferm. des « petites ». Si l'on prend pour base de comparaison les concentrations de MIA nécessaires pour produire le même degré d'inhibition chez les deux races, on voit que les « grandes » sont cinq à dix fois plus sensibles que les mutants. Peut-on interpréter ce résultat comme indiquant une différence dans les systèmes enzymatiques responsables de la fermentation aérobie ? On sait que le degré d'inhibition par le MIA, à une concentration donnée, dépend de plusieurs paramètres. Lorsqu'il s'agit de cellules entières, les paramètres principaux sont : la durée du contact des cellules avec l'inhibiteur, le pH du milieu, le rapport entre la quantité de cellules et la quantité d'inhibiteur. Tous ces facteurs influencent la perméabilité de la membrane cellulaire et peuvent de cette façon modifier le degré d'ini-

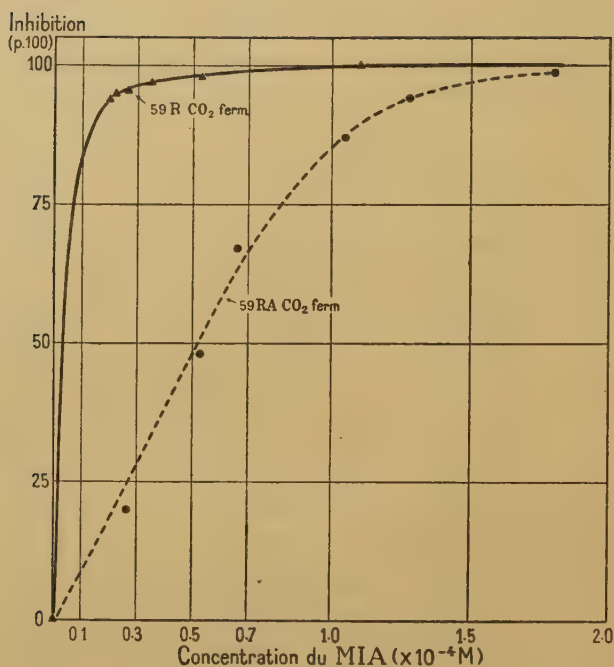


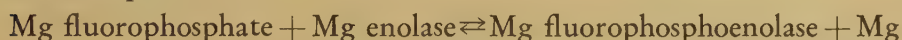
Fig. 6. — Action du monoiodoacétate de Na sur la fermentation aérobie des souches 59 R et 59 RA.
(Voir légende du tableau XII.)

bition. Les enzymes isolés, sensibles au MIA, peuvent être protégés *in vitro* par l'addition préalable de leurs substrats. Ce phénomène, découvert par RAPKINE (1938) dans le cas de la triosephosphate-déshydrogénase et par HOPKINS et coll. (1938) dans celui de la déshydrogénase succinique, peut évidemment être à la base des différences dans le degré de résistance mesuré par la vitesse globale de la fermentation. Il est difficile de trancher la question que l'on vient de poser. Un certain nombre d'arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle les différences entre « petites » et « grandes » ne sont pas dues aux différences de perméabilité cellulaire peut être avancé : *a*) les comparaisons des deux races ont été effectuées dans des conditions identiques ; *b*) un temps plus long de contact des cellules de la souche 59 RA avec l'inhibiteur (3 heures au lieu d'une heure) ne conduit pas à l'augmentation sensible de l'inhibition ; *c*) la différence de sensibilité des deux souches peut être observée sur des suspensions cellulaires qui présentent des rapports *quantité de cellules/quantité de MIA* bien différents ; *d*) le diamètre des cellules mutantes étant plus petit que celui des cellules normales

(EPHRUSSI et coll., 1949), le rapport *surface/volume* est plus grand chez les premières. Il nous semble donc que les résultats observés reflètent une différence réelle dans la résistance des systèmes enzymatiques au MIA.

3.242. LE FLUORURE DE SODIUM

Le Na F inhibe l'activité de plusieurs enzymes (cf. les revues de BERSIN, 1940 et MASSART, 1950), dont le plus important pour le métabolisme glucidique est l'énolase (LOHMANN et MEYERHOF, 1934 ; MEYERHOF et KIESSLING, 1935). L'énolase catalyse la réaction entre le D-2-phosphoglycérate et le phosphoenolpyruvate, avec formation d'une liaison riche en énergie. Le mécanisme par lequel le Na F affecte cette réaction a été élucidé par WARBURG et CHRISTIAN (1942) à l'aide d'une énolase cristallisée. L'inhibition résulte de la formation de fluorophosphate de Mg qui déplace l'ion Mg, nécessaire à l'activité de l'enzyme, dans sa combinaison avec l'énolase selon l'équilibre :



Les résultats de nos expériences peuvent être résumés comme suit :

1) Il n'est pas possible de rétablir chez le mutant une respiration normale en inhibant sa fermentation aérobie. La concentration 10^{-3} M, par exemple, réduit la fermentation aérobie de 59 RA de 93 % (Q_{CO_2} ferm. = 14,5 au lieu de 221 en absence de Na F), tandis que sa respiration reste inchangée ($Q_{O_2} = 2$). La même concentration d'inhibiteur est sans effet sur la respiration de la souche 59 R ($Q_{O_2} = 75$ au lieu de 76 en absence de Na F). Si le rétablissement de la respiration était possible, il aurait dû se manifester dans de telles conditions.

2) La respiration des « grandes » est considérablement inhibée par des concentrations de Na F supérieures à 5×10^{-3} M ; celle des « petites » ne semble pas l'être ⁽¹⁾.

3) Le Na F inhibe de façon tout à fait différente la fermentation aérobie des deux races (fig. 7). *Les cellules de 59 RA sont beaucoup plus sensibles que celles de 59 R.* Si on prend comme base de comparaison les concentrations de Na F nécessaires pour produire chez les deux races le même degré d'inhibition de la fermentation aérobie, on constate que les « grandes » sont environ vingt fois plus

⁽¹⁾ Le degré de précision des mesures ne nous permet pas d'être plus affirmatif.

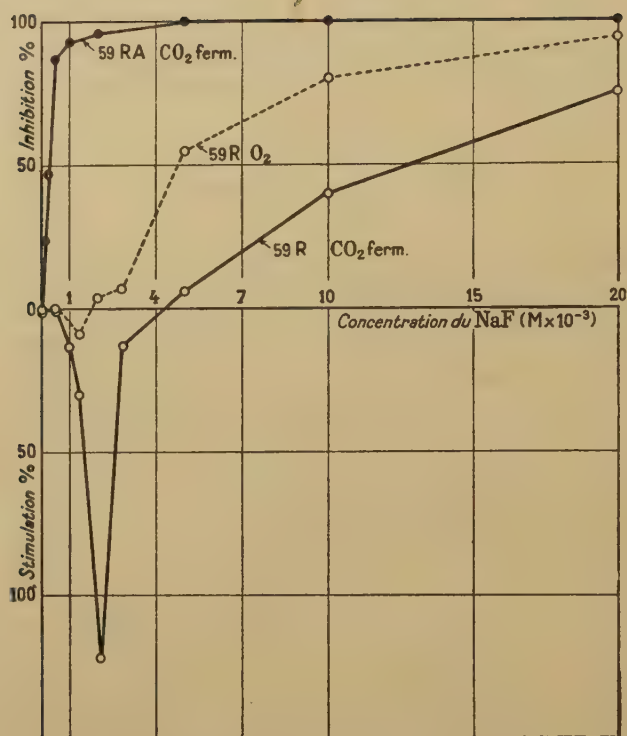


Fig. 7. — Action du Na F sur la respiration et la fermentation aérobie des souches 59 R et 59 RA. L'inhibition est calculée d'après le nombre de mm^3 de gaz absorbé ou dégagé pendant les premières 120 min. de contact avec le glucose à 4 %. Par fiole : 1,0 mg ps de levure cultivée pendant 3 j. dans le milieu 1g, mode I. Na F ajouté 1 h. avant l'addition du sucre.

résistantes que les « petites ». Dans une zone très étroite de concentrations, allant de 1×10^{-3} à 3×10^{-3} M, le fluorure, loin d'inhiber la fermentation des levures normales, la stimule au contraire considérablement (122 % à la concentration 2×10^{-3} M). Un tel effet n'a pas été observé chez les mutants.

Dans une série de travaux concernant l'action du Na F sur le métabolisme de la levure de boulangerie, RUNNSTRÖM et ses collaborateurs (RUNNSTRÖM et SPERBER, 1938 ; RUNNSTRÖM et coll., 1939, 1941 ; BOREI, 1940) ont apporté plusieurs renseignements à ce sujet. D'après ces auteurs, deux enzymes différents sont affectés par le fluorure : l'enolase et un enzyme de la respiration terminale

ayant un potentiel normal voisin de celui du cytochrome *b*. Ces deux enzymes se comportent vis-à-vis de l'inhibiteur de façon similaire. Ils peuvent être protégés contre son action par formation d' « unités de protection » qui sont le résultat de l'union de l'enzyme avec son substrat. Le degré d'inhibition serait fonction de l'intensité du métabolisme qui déterminerait la vitesse de formation et de décomposition de l' « unité de protection ».

Les expériences dont les résultats sont donnés par la figure 7 sont compatibles avec le point de vue de RUNNSTRÖM et coll. (*l. c.*). Chez les souches normales, les courbes d'inhibition de la respiration et de la fermentation sont analogues. La stimulation du catabolisme, observée dans la zone des concentrations de $1 \text{ à } 3 \times 10^{-3} \text{ M}$, résulte vraisemblablement de l'inhibition de la synthèse des polysaccharides (comme dans le cas du dinitrophénol, cf. CLIFTON, 1946). La plus grande sensibilité au NaF de la fermentation aérobie des « petites » peut être due soit au fait que l'enolase constitue dans cette race, mais non chez les « grandes », le facteur limitant la vitesse de leur catabolisme glucidique, soit à des différences dans la protection des enzymes. Il est intéressant de rappeler à ce propos que, d'après RUNNSTRÖM et coll. (1939), la fermentation anaérobie est inhibée beaucoup plus facilement que la fermentation aérobie. La comparaison des souches 59 R et 59 RA indique que la résistance au NaF ne dépend pas de l'oxygène *per se*. Ceci rend probable l'interprétation selon laquelle les systèmes enzymatiques qui catalysent la fermentation aérobie sont différents dans les deux races.

3.243. CYANURE DE K

L'action inhibitrice du $-\text{CN}$ est connue depuis une centaine d'années (Claude BERNARD, 1853). C'est grâce aux travaux de WARBURG (cf. 1928, 1948) que le cyanure est devenu un des moyens les plus utilisés dans l'analyse du métabolisme cellulaire. Il se combine avec les métaux lourds susceptibles de changer de valence, tels le fer et le cuivre. Il est généralement admis que, dans la respiration cellulaire, on peut distinguer deux systèmes : l'un, sensible au cyanure, dont rend compte le schéma de WARBURG-KEILIN (voir § 3.3) ; l'autre, non sensible au cyanure, dans lequel les flavoprotéines autoxydables jouent le rôle principal (cf. COMMONER, 1940). Selon WARBURG (1927), le premier de ces systèmes est responsable de la presque totalité (95 %) de la respiration chez la levure de boulangerie. L'effet de l'inhibition porte sur la cyto-

chrome-oxydase (KEILIN, 1930), de sorte que la réoxydation du cytochrome *c* réduit se trouve entravée.

La mesure de l'inhibition par le KCN de la respiration du glucose chez les levures normales ne présente aucune difficulté. La détermination de cette inhibition chez les « petites » se heurte, au contraire, à des difficultés considérables, qui découlent de la faible intensité de leur respiration, accompagnée d'une forte fermentation aérobie. Deux procédés expérimentaux ont été utilisés, dont les avantages et les défauts respectifs ressortent des considérations suivantes :

KREBS (1935) a montré que, pour obtenir une tension constante de HCN dans les fioles manométriques, il est nécessaire d'utiliser, pour l'absorption du gaz carbonique, un mélange de KOH + KCN au lieu du KOH pur. Pour des raisons identiques à celles exposées page 33, les concentrations de KOH + KCN qui empêchent la distillation de HCN (cf. UMBREIT et coll., 1949), ne sont pas suffisantes pour absorber complètement le CO₂ dégagé par la forte fermentation aérobie des « petites » lorsque la quantité de cellules est supérieure à 2 mg ps.

Un premier procédé qui permet d'éviter ces inconvénients consiste à faire un grand nombre de déterminations dans des conditions de tension de HCN constante, et de traiter statistiquement les données ainsi obtenues. Une autre technique possible est celle de CASTOR (1939). Elle consiste à placer une suspension dense de levure dans le diverticule latéral des fioles et un volume important de KOH dans le compartiment principal. Les inconvénients de cette technique sont : *a*) à partir de 6-7 mg ps de levure par fiole, l'agitation des manomètres ne suffit plus à assurer une bonne diffusion de l'oxygène ; *b*) la diminution continue de la tension de HCN dans les fioles ne permet de faire que des expériences de courte durée.

Des expériences ont été effectuées, selon le premier procédé, sur une même suspension de la souche 59 RA en présence et en absence de KCN 10⁻³ M. Elles ont donné respectivement les deux valeurs du Q_{O₂} sur glucose à 4 % de 2,8 mm³ ± 1,2 et 3,2 ± 0,7. Pour la même concentration d'inhibiteur, la respiration de la souche 59 R a été inhibée de 85 % et les deux valeurs du Q_{O₂} étaient respectivement 9,2 et 58.

Les résultats d'une expérience effectuée selon le deuxième procédé sont donnés par les graphiques de la figure 8, qui montrent que la respiration de la souche 59 R est réduite par le KCN 4 × 10⁻³ M à 20 % de sa valeur normale, et que la respiration résiduelle des « petites » n'est pas touchée.

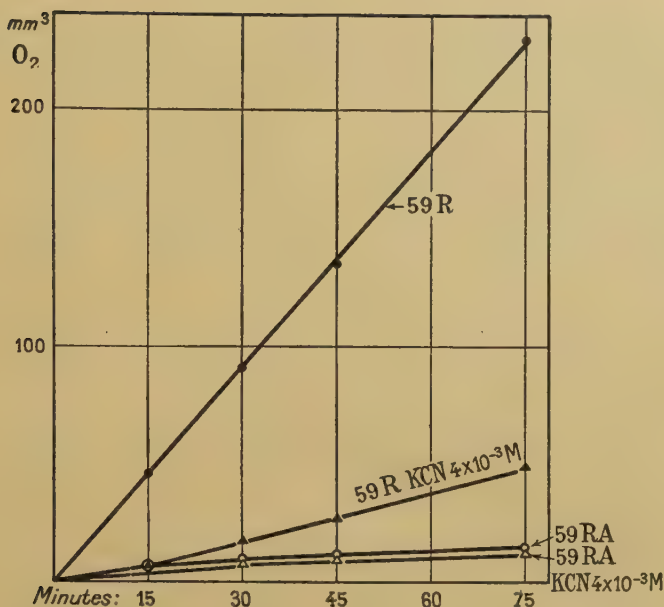


Fig. 8. — Action du KCN sur la respiration des souches 59 R et 59 RA.

Par fiole : 5 mg ps de levure cultivée pendant 5 j., milieu 1g, mode I. Glucose : 0,36 %.

Les résultats ci-dessus sont entièrement confirmés par une expérience portant sur l'inhibition de la respiration sur lactate. Etant donné que le lactate est utilisé par les deux souches uniquement par voie respiratoire, les difficultés techniques rencontrées dans l'étude

TABLEAU XIII

Inhibition de la respiration sur lactate par le KCN.

Levure	mm ³ d'O ₂ consommés pendant 45 min.				% d'inhibition de la respiration due au lactate
	—	KCN 10 ⁻³ M	lactate 0,05 M	lactate 0,05 M + KCN 10 ⁻³ M	
59 R 4,1 mg ps	68	25	106	26	$\frac{(106 - 68) - (26 - 25)}{(106 - 68)} = 97 \%$
59 RA 26,3 mg ps	19	15	53	47	$\frac{(53 - 19) - (47 - 15)}{(53 - 19)} = 6 \%$

Levure cultivée pendant 24 heures sur milieu 2, mode III, KCN ajouté 5 min. avant le substrat.

du métabolisme du glucose ne jouent pas. Comme l'indique le tableau XIII, la respiration due au substrat exogène est diminuée de 97 % chez la souche normale, alors que celle du mutant est pratiquement insensible au $\text{KCN} \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Nous pouvons donc conclure que les « petites » ne possèdent que le système respiratoire insensible au cyanure, tandis que la respiration des « grandes » se comporte à l'égard de cet inhibiteur comme chez les levures de boulangerie classiques.

3.25. *Discussion et conclusions du paragraphe 3.2*

1. La différence essentielle entre les souches « grandes » et « petites » concerne la respiration. Normale chez les premières, elle est réduite de 95-97 % chez les secondes. De plus, les expériences montrent que les souches mutantes, spontanées ou induites par l'acriflavine, se comportent de façon strictement semblable dans tous les tests auxquels elles ont été soumises. Jusqu'à preuve du contraire, nous les considérerons donc comme identiques. Nos résultats, obtenus à l'aide des méthodes manométriques, concordent parfaitement avec les résultats de TAVLITZKI (1949), qui a trouvé qu'au cours de la croissance aérobie, la quantité d'alcool formé par les « grandes » correspond à 8-10 % de la quantité de sucre disparu ; et que, chez les « petites », l'alcool formé représente 88 % du glucose. Dans les expériences sur des cellules non proliférantes, nous avons trouvé que les souches normales ne dégradent que 7 à 15 % du glucose par voie fermentaire, tandis que les mutants en fermentent 83 à 91 %. Il est donc évident que les différences dans le mode d'utilisation du sucre peuvent rendre compte des différences du rendement de croissance. Notons cependant que, si l'on admet pour la respiration et la fermentation du glucose des rendements énergétiques de 686 kg cal/mole et 54 kg cal/mole respectivement, les « grandes » devraient former 5 à 8 fois plus de matière vivante que les « petites ». Or, d'après TAVLITZKI (*l. c.*), le rapport est de 4.

L'absence de respiration et la présence de fermentation chez les « petites » permet d'expliquer aussi une autre caractéristique de ces races. EPHRUSSI et coll. (1949) ont constaté que les « petites » diploïdes (quelle que soit leur origine : croisement « petite » $\times$ « petite », mutations spontanées ou induite par l'acriflavine) ne sporulent pas. Or, on sait depuis les travaux de SAUTON (1910-13) et de SAUTON et JAVILLIER (1911) que la sporulation de nombreux microorganismes aérobies n'est possible qu'en présence d'une respiration active, et BRIGHT et coll. (1949) ont trouvé que l'accumula-

tion des produits de fermentation dans le milieu empêche la sporulation chez la levure de boulangerie.

2. La déficience respiratoire des « petites » est stable. Ceci est prouvé par l'identité des résultats obtenus avec des cultures de mutants tout récemment isolés, et avec des cultures ayant plusieurs milliers de générations cellulaires depuis leur isolement. Les « petites » se comportent donc autrement que les nombreuses levures caractérisées par une faible respiration. On sait que les levures de brasserie, surtout les levures basses, utilisent le sucre en le fermentant (MEYERHOF, 1925 ; JÖRGENSEN et HANSEN, 1948). Après culture prolongée à l'air, de telles levures acquièrent cependant les caractéristiques de la levure de boulangerie (HANSEN, 1905 ; FINK et BERWALD, 1933). Nous avons également observé ce phénomène sur une levure de brasserie basse, de la brasserie Graaf, à Rennes. Cette souche, d'origine monocellulaire, utilisait au départ 80 % du glucose par la voie fermentaire. Au bout de quelques repiquages, la fermentation ne représentait plus que 14 % du glucose consommé et le Q_{O_2} approchait la valeur typique des « grandes ». On trouvera dans le chapitre 4 du présent travail l'explication du phénotype des levures de brasserie. Le mécanisme de l'abolition de la respiration est, dans ce cas, entièrement différent de celui qui est responsable de la déficience respiratoire des « petites ».

On doit naturellement se demander si la déficience respiratoire des « petites » est entièrement indépendante des facteurs externes. Si on pouvait trouver un facteur capable de rétablir la respiration normale, on aurait un moyen d'analyse important du mécanisme physiologique de la mutation qui nous préoccupe ici. Un certain nombre d'expériences ont été réalisées dans ce but. WINZLER et coll. (1944) ayant montré que les levures ont souvent besoin de facteurs de croissance (biotine) pour respirer le sucre, nous avons essayé d'influencer la respiration des « petites » en ajoutant dans les fioles manométriques diverses vitamines ou l'extrait de levure. Les résultats ont été négatifs. GREEN (1936) et CHEN et TANG (1940) ont montré que la respiration des levures, bloquée par le cyanure, peut être rétablie dans une large mesure, par addition de bleu de méthylène ou de pyocyanine. LWOFF (1934) a établi que l'hématine est nécessaire à l'apparition de la respiration cyanosensible chez les Trypanosomides. L'addition de transporteurs d'hydrogène artificiels, tels que le bleu de méthylène ou la pyocyanine, ainsi que l'addition d'hématine, ou la culture en présence de cette substance, ne rétablissent pas la respiration chez les mutants.

3. Quelle est la cause de la déficience respiratoire des « petites » ? On a vu (§ 3.243) que la déficience ne porte que sur la respiration sensible au KCN, et correspond quantitativement à celle-ci. D'autre part, l'inhibition complète de la fermentation aérobie des « petites » ne conduit pas à l'augmentation de leur respiration ; la déficience respiratoire n'est donc pas due à une exagération du pouvoir fermentaire. L'étude du métabolisme des corps en C_2-C_4 indique aussi que la mutation a pour effet de bloquer la partie « terminale » de la respiration cellulaire. Les données décrites dans le paragraphe 3.3 nous permettront de répondre à cette question.

4. Contrairement à la fermentation anaérobie, la fermentation aérobie du glucose diffère chez les deux races. Elle est très faible chez les « grandes », alors que chez les « petites » elle est pratiquement aussi forte que dans l'azote. La signification de ce phénomène sera discutée plus loin (§ 4.6). L'action des inhibiteurs sur la fermentation aérobie suggère (bien que la différence de la perméabilité cellulaire n'ait pu être entièrement écartée) que les systèmes enzymatiques qui la catalysent sont différents dans les deux races. En effet, la fermentation aérobie des « petites » est 5 à 10 fois *moins* sensible à l'acide monoiodoacétique et 20 fois *plus* sensible au Na F que celle des « grandes ». Cette constatation concorde avec l'observation que les préparations dépourvues de cellules (jus de LEBEDEFER ou « broyat ») obtenues à partir des mutants, fermentent le glucose ou l'hexosediphosphate beaucoup plus rapidement que celles préparées à partir des souches normales. Les mutants se comportent donc à cet égard comme les levures de brasserie. Une étude comparée plus approfondie de la fermentation des deux races peut se révéler fructueuse dans l'élucidation d'un phénomène bien connu depuis cinquante ans mais inexpliqué : les préparations de levures de boulangerie, dépourvues de cellules, possèdent un pouvoir fermentaire bien plus petit que des préparations analogues de levures de brasserie, bien qu'il n'y ait pas de différence dans la fermentation anaérobie par les cellules intactes (cf. OPPENHEIMER, 1938).

5. Le catabolisme endogène des mutants présente une intensité extrêmement réduite. Les expériences indiquent que les « petites » sont capables de former des réserves endogènes à partir du glucose, mais que la dégradation respiratoire de celles-ci est presque complètement abolie.

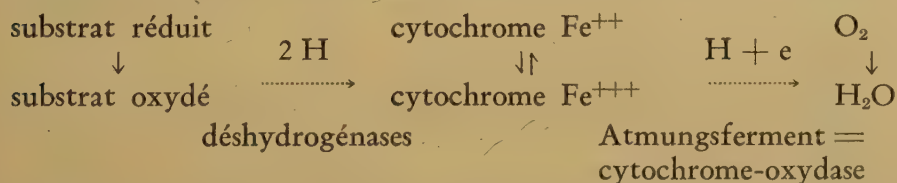
3.3. SYSTÈMES ENZYMATIQUES DE LA RESPIRATION TERMINALE

Nous allons essayer de comprendre maintenant les causes de la déficience respiratoire des mutants. Avant d'aborder la description

des expériences, nous donnerons un bref aperçu du mécanisme de la respiration « terminale » chez la levure.

La discussion de l'activation de l'hydrogène (WIELAND et THUNBERG) et de l'oxygène (WARBURG) fut à la base de l'explication du mécanisme de la respiration cellulaire. La découverte des systèmes intermédiaires entre le substrat et l'oxygène (KEILIN), ainsi que l'étude des potentiels d'oxydoréduction (CLARK, MICHAELIS, WURMSER) a mis fin à cette controverse. Quatre types de méthodes complémentaires ont été utilisés pour élucider ce mécanisme : *a)* Observation spectroscopique directe des substances intervenant dans la chaîne d'oxydations. La plupart de ces substances possèdent, à l'état oxydé ou réduit, un spectre d'absorption caractéristique. Il est donc possible d'étudier leur comportement *in situ* ; *b)* Utilisation d'inhibiteurs qui se combinent sélectivement avec les catalyseurs de la respiration. Entre les mains de WARBURG, cette méthode a permis de connaître le spectre d'absorption photochimique du « ferment respiratoire rouge » (Atmungsferment) ; *c)* Recherche des conditions physico-chimiques qui déterminent les réactions de la respiration ; *d)* Méthodes enzymatiques habituelles.

La voie principale de la respiration passe, dans sa partie « terminale », par des catalyseurs hémoprotéiques. L'acheminement de l'hydrogène et des électrons fournis par le substrat vers l'oxygène moléculaire s'effectue selon le schéma de WARBURG et de KEILIN :



Les déshydrogénases, dont on connaît aujourd'hui une trentaine, ont généralement une spécificité étroite envers le donateur d'hydrogène, c'est-à-dire le substrat. Elles transfèrent l'hydrogène à l'accepteur, qui peut être soit le cytochrome (transfert direct), soit le coenzyme I ou II, soit une flavoprotéine. Certains colorants électro-actifs peuvent servir d'accepteurs non-physiologiques. Les coenzymes réduits sont oxydés à leur tour, soit en cédant leur hydrogène à d'autres substrats, la réaction étant catalysée par les déshydrogénases travaillant en sens inverse (c'est donc une fermentation, voir § 3.1), soit aux flavoprotéines. Ces dernières peuvent réagir directement avec l'oxygène moléculaire, certaines d'entre elles étant autoxydables, ou bien le transfert d'électrons et d'hydrogène s'effectue par l'intermédiaire de la chaîne des cytochromes. Les cyto-

chromes non autoxydables sont oxydés par la cytochrome-oxydase qui réduit l'oxygène avec formation d'eau. Les trois étapes d'oxydo-réductions catalysées par les phosphopyridine-nucléotides, les flavo-protéines et les cytochromes correspondent respectivement à trois niveaux de potentiel : $-0,3\text{ V}$; $-0,06\text{ V}$ et $+0,2$ à $+0,3\text{ V}$. Il est vraisemblable que le transfert s'effectue dans le sens *cyt. b* $\rightarrow$ *cyt. c* $\rightarrow$ *cyt. a*, car les valeurs de E_o' sont respectivement $-0,06\text{ V}$, $+0,25\text{ V}$ et $+0,29\text{ V}$. La figure 9 schématise les diverses voies de la respiration « terminale » de la levure.

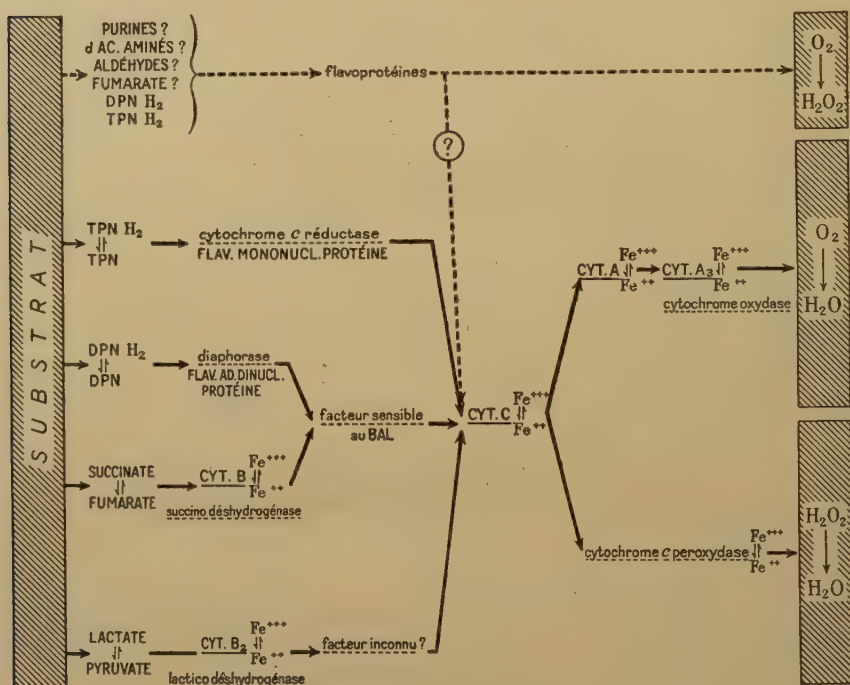


Fig. 9. — Schéma de la respiration terminale de la levure.

Les *cytochromes* [cf. les revues de KEILIN (1933) et de PAUL (1951)] sont des hémochromogènes natifs qui présentent à l'état réduit un spectre bien défini à deux maxima dans le visible et un dans l'ultraviolet. Ils ont été observés par McMUNN dès 1885-89, mais cette découverte a soulevé des critiques si sévères qu'elle fut complètement négligée jusqu'en 1925, année où KEILIN a commencé ses recherches sur la respiration cellulaire. La distinction des cytochromes est fondée avant tout sur leurs propriétés spectroscopiques qui varient suivant la nature du groupement prosthétique

et de la protéine, ainsi que selon l'état physique de l'hémoprotéine. On trouvera dans le tableau XIV les principales caractéristiques des divers cytochromes.

Les cytochromes catalysent la plus grande partie de la respiration de presque toutes les cellules. Ceci ressort des constatations suivantes : *a*) la respiration est fortement inhibée par le cyanure, par le CO à l'obscurité, et par l'azoture qui inhibent la cytochrome-oxydase ; *b*) la vitesse des oxydations et réductions du cytochrome *c* dans une cellule intacte de levures rend compte de la totalité de sa consommation d'oxygène ; *c*) le système des cytochromes, soit typique, soit modifié, est présent dans toutes les cellules animales, végétales ou microbiennes qui possèdent une forte respiration et est absent chez les anaérobies stricts.

3.31. Spectres d'absorption des cellules intactes

L'examen spectroscopique des cellules intactes révèle des différences profondes entre les deux types de levures étudiés ici.

Une suspension ou un gâteau de levure normale ⁽¹⁾, placé sous le spectroscope de réversion de Hartridge, montre après réduction (par l'hydrosulfite de Na ou par absence d'oxygène) le spectre classique des cytochromes, décrit par KEILIN (1925, 1927). On y distingue une forte bande symétrique dont le milieu est à 550-551 m μ (bande α du cytochrome *c*), une autre (αb) à 563-4 m μ , une troisième (αa) à 602-604 m μ et une large bande que l'on peut décomposer en deux bandes β , l'une à 530 m μ (βb) et l'autre à 521 m μ (βc) approximativement (fig. 10 et 33). Les intensités de ces bandes suivent l'ordre $\alpha c > \alpha b > \alpha a > \beta c$ et βb . Lorsqu'on plonge une telle levure dans l'air ou l'azote liquide (approximativement — 170° et — 190°) et l'examine aussitôt, on voit les mêmes bandes, considérablement intensifiées et décalées à 547 m μ (αc), 559-560 m μ (αb) et 599-600 m μ (αa). La dernière bande semble asymétrique : elle est plus intense du côté des grandes longueurs d'onde. En outre, on peut déceler, entre les bandes αc et αb , la bande mince et très faible du cytochrome *e* (553 m μ) récemment décrit par KEILIN et HARTREE (1949). Si l'on chauffe la suspension pendant 20 minutes à 80°, et l'examine, après réduction, à la température ordinaire, on ne voit que les bandes du cytochrome *c* (KEILIN, 1925) : α à 549-550 m μ et β à 520 m μ . Tous les autres cytochromes ont été détruits par le chauffage. Une large et faible

(1) Notons que les gâteaux de levures normales présentent une teinte gris-brunâtre, tandis que les gâteaux des « petites » sont légèrement rosés.

bande peut être observée aux environs de 580 m μ : elle correspond vraisemblablement à un hémochromogène artificiel, qui doit son origine à l'union du groupement prosthétique du cytochrome *a* et d'une protéine dénaturée par la chaleur, car on sait que l'hème *a* donne des hémochromogènes qui présentent une bande α aux environs de 580 m μ (cf. LEMBERG et FALK, 1951).

L'observation dans l'air liquide de la préparation chauffée confirme la destruction des cytochromes *b* et *a* ; il est cependant difficile d'affirmer que la destruction du cytochrome *b* est totale, car on décèle du côté du cytochrome *c* un noircissement flou qui s'estompe progressivement pour disparaître vers 559 m μ . Cette ombre, dont il nous est impossible pour l'instant d'interpréter la signification, ne nous permet pas d'affirmer que la mince bande du cytochrome *e* disparaît à la suite du chauffage.

Observé dans les mêmes conditions, le spectre des « petites » présente les caractéristiques suivantes : à la température du laboratoire on voit une très forte bande d'absorption (αc) centrée à 549-550 m μ ⁽¹⁾ et une bande plus faible (βc) à 520 m μ (fig. 10 et 33). En augmentant l'épaisseur de la suspension, ou en la congelant dans l'air liquide, on décèle parfois du côté rouge du cytochrome *c* un noircissement flou et on observe une troisième bande, large et faible, qui se situe aux environs de 580 m μ et qui correspond au cytochrome *a*₁ (KEILIN, 1936). La bande αe semble être absente, mais il est difficile de l'affirmer, car, même chez la souche normale, elle est très faible. Le chauffage pendant 20 minutes à 80° ne modifie pas le spectre d'absorption et l'examen à — 170° des préparations chauffées permet de constater que la bande αc (547 m μ) possède, du côté des grandes longueurs d'onde, une ombre très faible qui s'estompe progressivement pour disparaître vers 555 m μ .

Les caractéristiques spectroscopiques qui viennent d'être décrites se retrouvent chaque fois que la culture a lieu en aérobiose dans les milieux naturels 1, 1g, 2, 3, 3g et dans les milieux synthétiques 4, 4g, 5 et 5g, et que le mode de culture soit I, IV ou VI. Nous avons vérifié en outre que l'âge physiologique de la population cellulaire ne modifie pas qualitativement le spectre d'absorption. Les expériences ont été faites sur les souches 59 R et 59 RA ayant proliféré dans des boîtes de Petri sur milieu 1g et dans des tubes à barbotage contenant le milieu 5. Les prélèvements, effectués au

(1) Les positions de la bande αc , déterminées dans des cellules intactes des « grandes » et des « petites » diffèrent légèrement. Elles sont : 550,7 m μ et 549,5 m μ respectivement. Cette différence n'est qu'apparente et résulte de la présence chez les premières du cytochrome *b* car, après sa destruction par le chauffage, la différence disparaît.

TABLEAU XIV
Nomenclature et propriétés des cytochromes (*)

Nomenclature et références principales	Distribution	Spectre à l'état réduit	E'_0 à pH = 7	Groupe prosthétique ; hémochromogène pyridinique (hp)	Propriétés : autox = autoxydable thl = thermolabile ths = thermostable
<i>a</i> Keilin 1925 Keilin et Hartree 1939 Rawlinson et Hale 1949 Lemberg et Falk 1951	Générale	α : 602-5 γ : 452 (faible) pas de β ?	0,29	porphyrine <i>a</i> = 4-éthyl-2-formyl-1, 3, 5, 8 tétraméthyl porphyrine-6 ac. acrylique - 7 ac. propionique α hp : 587	Non autox., thl., non soluble. Pas d'affinité pour CN ou CO.
<i>a</i> ₁ Warburg 1931 Fink 1932 Fujita et Kodama 1934 Keilin 1934 et 1936	Bactéries Levure	α : 580-90		comme <i>a</i> ? α hp : 580-90	Acetobacter : autox. homologue de <i>a</i> ₃ ? Levure : non autox., non soluble.
<i>a</i> ₂ Tamiya et coll. 1930-1933 Negelein 1934 Keilin et Harpley 1941	Bactéries	α : 628-32		pas une porphyrine ; pigment biliaire-hème ? hp : 625, 603	Autox. affinité grande pour CN et CO non sol. homologue de <i>a</i> ₃ ?
<i>a</i> ₃ Keilin et Hartree 1939	Muscle cardiaque Générale ?	α : 602-5 γ : 448 (forte) pas de β ?		comme <i>a</i> ? α hp : 587 ?	Autox., thl., non sol., affinité grande pour CO et CN ; vraisemblablement identique à la cytochrome oxydase.
<i>b</i> Keilin 1925	Générale	α : 563-6 β : 528 γ : 432	- 0,05	protohème α hp : 557-8	Légèrement autox., thl., non sol., pas d'aff. p ^r CN ou CO.
<i>b</i> ₁ Huszak 1942, Tsou 1951 Fink 1932 Keilin et Harpley 1941 Sanborn et Williams 1950 Chaix et Kiun 1943	Surrénales Levure E. Coli Cecropia B. subtilis	α : 559 α : 557-9 α : 560-2 α : 558 α : 557 β : 527 γ : 424		<i>protohème ?</i> vraisembl. n'existe pas, la bande <i>b</i> ₁ résulte de la fusion apparente des bandes <i>ab</i> (très forte) et αc (faible). Bande complexe, se scinde à -170° à 551 et 559. oxydation du <i>b</i> ₁ insensible au H ₂ S.	
<i>b</i> ₂ Bach et coll. 1946	Levure	α : 556 β : 531 γ : 420	< <i>c</i>	protohème α hp : 557-8	légèrement autox., thl., soluble.
<i>b</i> ₃ Hill 1951	Plantes vertes	α : 560		protohème ?	autox., pas d'affinité pour CO, thl.
<i>c</i> Keilin 1925 Keilin et Hartree 1937 Wurmser et Filitti-Wurmser 1938 Theorell 1939	Générale	α : 549,5 β : 521 γ : 415	0,25	porphyrine <i>c</i> = protoporphyrine avec une mol. de cystéine liée à chaque vinyle α hp : 550	non autox., ths., p. m. = 16.500 (0,34 % Fe). Faible affinité pour CN et NaN ₃ . Pas d'affinité pour CO.
<i>c</i> ₁ Yakushiji et Okunuki 1940 Slater 1949 <i>b</i>	Muscle cardiaque	α : 551-2	$c > c_1 > b$	vraisemblablement un artefacte.	
<i>e</i> Keilin et Hartree 1949	Générale ?	α : 552 (- 170°)	< <i>b, c, a</i>		
<i>f</i> Hill 1943-1951	Plantes vertes	α : 555 (complexe) β : 530	> <i>c</i>		non autox., soluble, pas d'affinité pour CO.

(*) La distinction des cytochromes est fondée presque exclusivement sur leur spectre. Quand les différences spectroscopiques sont petites, il en résulte parfois une certaine confusion (divers cytochromes *a*₁ et *b*₁).

cours de la phase exponentielle de la croissance (2 générations avant l'arrêt de la croissance) et un ou deux jours après son arrêt, ont toujours montré la même différence entre la souche normale et mutée. Les cultures des « grandes » âgées de plus de 10 jours (boîtes

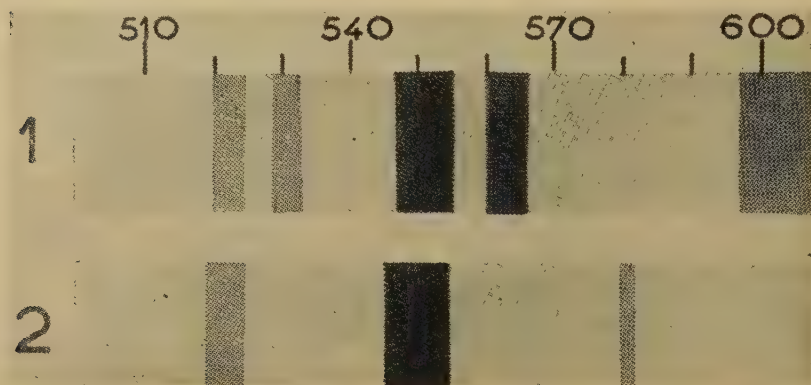


Fig. 10. — Spectres d'absorption des souches 59 R (1) et 59 RA (2).
Levures cultivées pendant 3 j. dans le milieu 1g, mode I.

de Petri, milieu 1g), qui sont arrêtées dans leur multiplication depuis une semaine environ, forment un pigment brunâtre qui gêne l'observation spectroscopique des cytochromes.

Nous avons étendu l'examen spectroscopique à une vingtaine de souches dont une partie est donnée dans la liste de la page 5. Toutes les souches diploïdes et haploïdes, quelles proviennent de « Yeast Foam » ou de « Boulangerie II », qui ont été classées comme « grandes » d'après leur métabolisme du glucose, montrent un spectre identique à celui de 59 R. Celles qui sont classées comme « petites », montrent au contraire un spectre identique à celui de 59 RA.

En résumé, nous pouvons donc dire que les « grandes » possèdent les cytochromes *c*, *b*, *a* et *e*, tandis que les « petites » ne montrent que les cytochromes *c* et *a*₁.

3.32. Cytochrome *c*

Malgré la position normale des bandes du cytochrome *c* de toutes les souches étudiées, nous nous sommes demandé si le cytochrome *c* des levures mutantes était bien identique à celui des levures normales car, comme on le verra plus loin (§ 3.3411), il demeure con-

stamment réduit dans la cellule. Nous l'avons donc extrait par un procédé qui ne diffère de celui de KEILIN (1930) que par le fait que les filtrations sont remplacées par des centrifugations. Les quantités de réactifs utilisées sont proportionnelles à la quantité de levure. Les solutions brutes de cytochrome *c* (fraction A de KEILIN, 1930) ainsi obtenues à partir de levures normales (59 R) et mutante (59 RA) ont été examinées à l'aide du spectrophotomètre. Les courbes d'absorption trouvées sont reproduites dans la figure 11. On voit que les deux courbes sont parallèles et sont donc dues à la même substance. La différence entre les quantités de cytochrome *c* trouvées peut être due soit à ce que la teneur en cytochrome *c* des

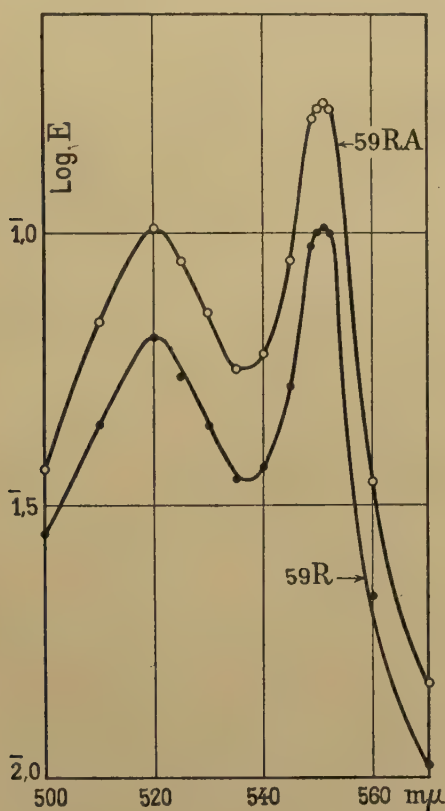


Fig. 11. — Courbes d'absorption des cytochromes *c* réduits extraits des souches 59 R et 59 RA.

Extraction de 5 g p. h. de levure cultivée pendant 3 j. dans le milieu 1g, mode I.
Volume final : 4 cm³.

« petites » est plus grande que celle des « grandes », soit à ce que l'extraction n'est pas quantitative et est inégale dans les deux cas, soit, bien entendu aux deux facteurs à la fois. KEILIN et HARTREE (1940) et TSOU (1951 *b*) ont montré que la molécule du cytochrome *c* peut perdre complètement son activité catalytique à la suite de différents traitements (action des alcalis et des acides forts, digestion par les enzymes protéolytiques) sans que son spectre d'absorption dans le visible subisse de changement perceptible. Il est donc clair que seule une étude de l'activité catalytique du cytochrome *c* peut résoudre le problème de l'intégrité de sa molécule. Une telle étude ne peut être effectuée qu'*in vitro*.

Nous avons donc comparé des cytochromes *c* d'origines diverses (muscle cardiaque, levures 59 R, 59 Rp et 59 RA) vis-à-vis de la cytochrome-oxydase.

La cytochrome-oxydase est préparée selon la méthode de KEILIN et HARTREE (1938) à partir du cœur de cheval. En présence de cytochrome *c* $3,5 \times 10^{-5}$ M et d'hydroquinone, nos préparations montrent un $Q_{O_2} = 80$ à 130. Le cytochrome *c*, qui sert de témoin, est préparé à partir du même matériel, selon le procédé de KEILIN et HARTREE (1937). Le cytochrome *c* de la levure est extrait comme il a été indiqué plus haut. Les préparations sont dialysées contre NaCl 0,5 % et standardisées au spectrophotomètre. Comme le montre la figure 12, le cytochrome *c* extrait des levures « petites » possède *in vitro* la même activité catalytique que le cytochrome *c* extrait des souches normales ou du muscle cardiaque.

Le dernier problème auquel nous essaierons de répondre, est de savoir s'il existe une différence entre les « grandes » et les « petites » quant à la teneur en cytochrome *c*. L'observation spectroscopique des suspensions cellulaires, réduites par l'hydrosulfite, montre que la bande αc est plus intense et un peu plus large chez le mutant (fig. 10). Les dosages effectués selon la technique décrite au paragraphe 2.6 sur des levures ayant proliféré pendant trois à cinq jours en aérobiose (milieu 1g, mode I) ont fourni, pour le cytochrome *c* des différentes souches, les chiffres suivants (en μ moles par g ps) : B II - 0,073 et 0,091 ; 59 R - 0,073 et 0,085 ; 59 RA - 0,12 et 0,14 ; 59 Rp - 0,12 et 0,13. Les souches mutantes présentent donc une teneur en cytochrome *c* 1,6 à 1,7 fois plus grande que les souches normales. Des résultats analogues ont été obtenus avec des souches dérivées de la levure américaine « Yeast Foam ». Les valeurs trouvées pour deux souches normales, 141a et 140-3d, sont respectivement 0,13 et 0,16 μ moles/g ps ; celles trouvées pour les « petites acriflavinées » dérivées des souches précédentes : 0,25 et 0,25 μ .

moles/g ps. Bien que les valeurs absolues soient ici différentes des précédentes (ce qui montre des variations considérables selon le génotype, même parmi les souches normales), les rapports des teneurs en cytochrome *c* des « petites » et des « grandes » sont sen-

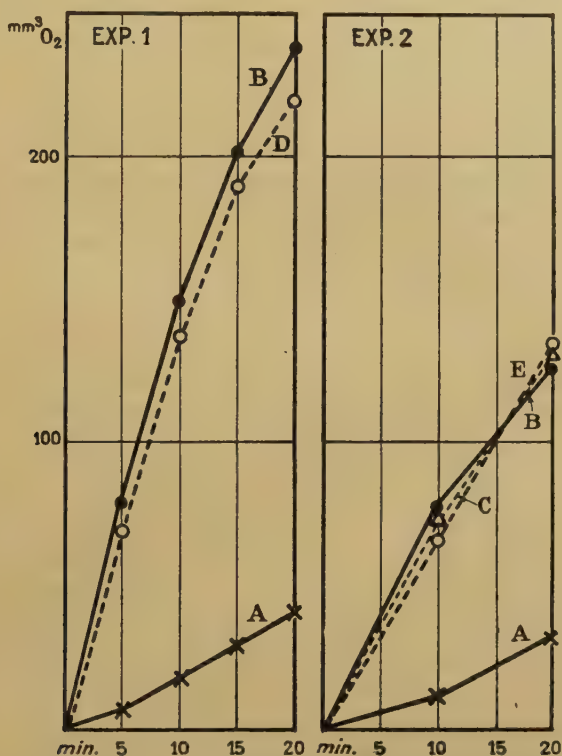


Fig. 12. — *Activité de cytochromes c d'origines diverses en présence de cytochrome-oxydase du muscle cardiaque.*

Hydroquinone 0,01 M ; tampon phosphate pH 7,3, 0,08 M ; cytochrome *c* : exp. 1 : $3,5 \times 10^{-5}$ M, exp. 2 : $2,3 \times 10^{-5}$ M.

A : omission de cytochrome *c* ; B, C, D et E : cyt. *c* du muscle cardiaque, de 59 R, de 59 RA et de 59 Rp respectivement.

siblement les mêmes (1,9 et 1,7) que dans le cas des souches dérivées de B II. On peut donc conclure que, dans certaines conditions, les « petites » contiennent plus de cytochrome *c* que les « grandes ». Remarquons cependant que cette différence ne semble pas être aussi constante que les autres caractéristiques qui différencient les deux

rares. Elle est observée lorsque la croissance a eu lieu pendant 2 jours ou plus dans des boîtes de Petri contenant le milieu 1 g. Si on cultive la levure pendant 24 heures dans la bouteille tournante (mode VI) contenant du milieu liquide 3, la teneur en cytochrome *c* des « petites » se rapproche de celle des « grandes ». Il est difficile pour l'instant d'expliquer cette divergence. Elle peut être due aussi bien à des différences dans la composition du milieu nutritif qu'à des différences dans l'âge physiologique des cultures. D'après CHAIX et RONCOLI (1950) le spectre des cytochromes de la levure de boulangerie varie avec l'âge physiologique de la culture.

Notons enfin que la méthode de dosage que nous avons employée permet la comparaison des teneurs en cytochrome *c* de souches différentes, mais les valeurs absolues qu'elle fournit peuvent être erronées (cf. § 2.6). Nous avons donc essayé diverses techniques d'extraction du cytochrome *c*. L'extraction n'a cependant jamais été complète : à en juger par les estimations *in situ*, nous avons réussi à extraire tout au plus 15 % du cytochrome *c* ⁽¹⁾. Nos rendements ont cependant été meilleurs que ceux (0,005 μ mole/g ps) obtenus par FUJITA et coll. (1939) et EULER et coll. (1939), mais inférieurs aux extractions obtenues par BOREI et SJÖDEN (1943) (0,02 μ mole/g ps). La technique de ces auteurs, dont nous n'avons eu connaissance que récemment, semble être la mieux adaptée à la levure. Quelques essais ont été effectués à l'aide de cette technique. Elle nous a permis d'extraire environ un tiers du cytochrome *c* des cellules normales et mutantes. Les teneurs trouvées par KEILIN et HARTREE (1940) pour une levure de boulangerie (0,16 μ mole/g ps), ainsi que par HAAS (1934) (0,06 μ mole/g ps), concordent bien avec l'ordre de grandeur fourni par nos estimations *in situ* sur différentes souches normales. Il serait important de vérifier la valeur de nos estimations *in situ* par une méthode permettant de déterminer le coefficient d'extinction du cytochrome *c* dans un milieu diffusant (cf. WURMSER, 1948 ; CHANCE, 1952).

3.33. *Respiration des préparations non-cellulaires*

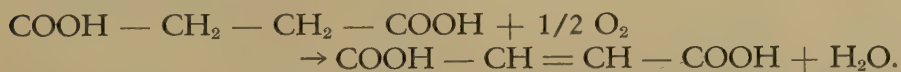
Il est inutile de souligner l'importance, pour la compréhension du métabolisme cellulaire, de l'étude des préparations dépourvues de cellules. Bien que la levure ait été le premier matériel biologique étudié par cette méthode (« Hefe Press-Saft » de BÜCHNER, 1897), il est étonnant de constater qu'il n'existait pas de technique permet-

(1) Une situation tout à fait analogue se retrouve dans le cas du cytochrome *f* des plantes vertes (cf. HILL, 1951).

tant d'obtenir, à partir de la levure, des préparations non-cellulaires présentant une respiration comparable à celle des cellules intactes (KREBS, 1949). Les préparations enzymatiques classiques (jus de Lebedeff, Press-Saft, Azeton-Hefe, zymine et lysat par le toluène, cf. OPPENHEIMER, BAMANN et MYRBÄCK) montrent une fermentation très active, mais leur respiration est pratiquement nulle. LYNEN (1939), LYNEN et NECIULLACH (1939) admettent que la destruction de la structure de la cellule de levure conduit à la disparition de la consommation d'oxygène.

L'introduction des techniques de désintégration mécanique à froid, a permis l'obtention, à partir de nombreux microorganismes, de préparations montrant une forte respiration (cf. UTTER et coll. 1946 ; UMBREIT et coll., 1949). Nous avons mis au point un procédé analogue ⁽¹⁾ dont la description détaillée est donnée dans le paragraphe 2.71. Le « broyat » ainsi obtenu à partir de levures normales respire très fortement. La figure 13 montre la respiration des broyats de 59 R et de 59 RA. La vitesse initiale de la respiration endogène du broyat des « grandes » est plus grande que la vitesse de la respiration endogène des cellules intactes inanitiées, à partir desquelles il a été préparé. Autrement dit, la destruction de la structure cellulaire, loin d'abolir la respiration, l'accélère. Ce fait, à première vue paradoxal, est banal, et a été décrit à plusieurs reprises, en particulier dans les cas des œufs de grenouille (BRACHET, 1944), de *Sabellaria* (FAURE-FREMIET, 1924) et d'*Arbacia* (TANG, 1932). Vraisemblablement, le système respiratoire est loin d'être saturé par le substrat endogène dans les cellules intactes (cf. § 3.23). Le broyage accélère temporairement les oxydations cataboliques en libérant ce substrat.

La respiration du broyat de 59 R est stimulée par le succinate et par le lactate. Ces deux corps sont oxydés quantitativement, puisque pour 10 μ moles de succinate, 104 mm³ de O₂ ont été consommés, ce qui rend compte de la réaction :



D'un autre côté, pour 9,1 et 27,3 μ moles de dl-lactate, la consommation d'O₂ a été de 97 mm³ et de 296 mm³ respectivement, ce qui correspond à l'oxydation du dl-lactate en pyruvate. Aucun autre substrat essayé (glucose, pyruvate, alcool, malate) n'augmente l'intensité respiratoire. Il est aisé de comprendre que, parmi les sub-

(1) FOULKES (1950) a décrit récemment une préparation enzymatique (broyat de levures) dont les propriétés sont similaires à celles de notre « broyat ».

strats exogènes, seuls le succinate et le lactate soient respirés, car eux seuls sont oxydés directement par les cytochromes, tandis que les autres corps requièrent l'intervention de médiateurs supplémentaires (fig. 9). Or, il est connu que la probabilité de fonctionnement

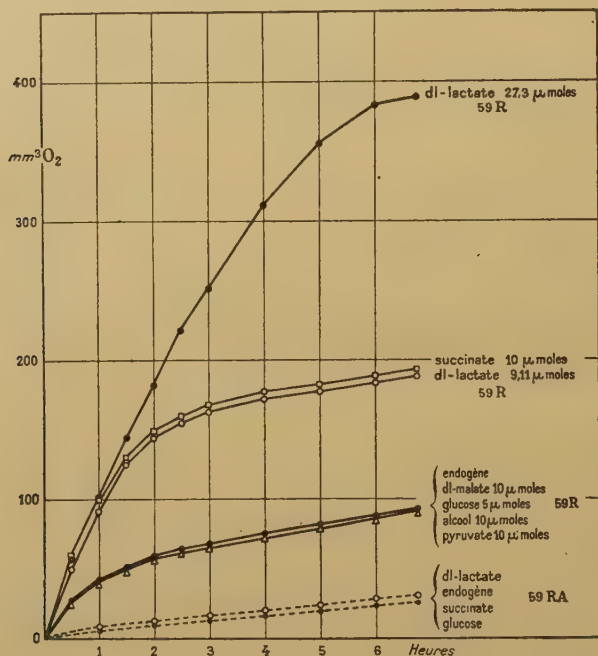


Fig. 13. — *Respiration des broyats de 59 R et 59 RA.*
Broyats non dialysés obtenus à partir des levures cultivées sur du milieu Ig, mode I et inanitiées par passage d'air comprimé pendant 18 h. dans du tampon phosphate M/15, pH 4,6. Par fiole : 2 cm³ de broyat.

in vitro d'un système complexe est d'autant plus petite qu'il comporte un plus grand nombre de chaînons successifs (cf. discussion dans KREBS, 1943).

La faible respiration du broyat des mutants n'est pas stimulée par l'addition de succinate ou de lactate (fig. 13).

3.34. Les systèmes enzymatiques oxydant le cytochrome *c*

Nous allons commencer l'étude comparée des enzymes oxydant le cytochrome *c* chez les souches normales et mutantes par l'examen de l'activité du système entier (cytochrome *c* + cytochrome-oxydase) des cellules intactes. Cet examen comportera des expé-

riences sur l'oxydation du cytochrome *c in situ* et sur l'oxydation de la paraphénylènediamine. Nous comparerons ensuite les extraits dépourvus de cellules, ce qui nous permettra d'étudier plus particulièrement les propriétés de la cytochrome-oxydase. La discussion des résultats terminera ce paragraphe.

3.341. ETUDE DES CELLULES INTACTES

3.3411. Oxydation du cytochrome *c in situ*

KEILIN (1925) a observé que les bandes α et β du cytochrome *c* disparaissent lorsqu'on fait barboter de l'air dans une suspension de levure. Ceci est dû à l'oxydation du cytochrome *c* dont la forme oxydée ne présente pratiquement pas de spectre reconnaissable dans le visible. Le comportement de la bande α *c* envers l'oxygène moléculaire permet donc la mise en évidence de l'activité de la cytochrome *c*-oxydase dans les cellules intactes. On observe chez les souches « grandes » une situation identique à celle décrite par KEILIN (*l. c.*).

La même expérience, réalisée avec une suspension de 59 RA donne un résultat entièrement différent : quelles que soient la durée et la vitesse du passage d'oxygène, et la densité de la suspension, on observe le spectre du cytochrome *c* réduit. En outre, les dosages de la forme réduite du cytochrome *c* par compensation de l'intensité de la bande α *c* (voir § 2.6) après passage d'oxygène montrent que tout le cytochrome *c* reste à l'état réduit. Ce test conduit donc à la conclusion que le cytochrome *c* des levures mutantes ne peut pas être oxydé *in situ* par l'oxygène moléculaire. Il peut cependant être oxydé *in situ* par des oxydants tels que H_2O_2 ou le ferricyanure de K, ou, après l'extraction, par la cytochrome-oxydase du muscle (voir § 3.32).

3.3412. Oxydation de la diméthyl-*p*-phénylènediamine (ppd).

On sait depuis longtemps (EHRlich, 1885 ; BATTELLI et STERN, 1912) que la plupart des cellules vivantes possèdent un enzyme qui oxyde à l'aide de l'oxygène moléculaire le réactif « Nadi » (α naph-tol + ppd) en donnant le bleu d'indophénol, et la ppd en donnant une diimine qui se transforme spontanément en un produit coloré. L'enzyme qui catalyse cette réaction a été appelé « indophénol-oxydase », et son étude a permis de mieux comprendre le système « terminal » de la respiration cellulaire (KEILIN, 1929). Il devint par la suite de plus en plus évident que, dans certains cas au moins (muscle cardiaque, rein), l'indophénol-oxydase n'oxyde que le cytochrome *c* ; celui-ci oxyde à son tour le réactif Nadi par une réaction non enzymatique (KEILIN et HARTREE, 1938 ; SLATER, 1949). Il est

cependant démontré que la réaction du Nadi n'est pas spécifique. L'utilisation de ce test doit donc être accompagnée d'une étude plus approfondie de l'activité du système cytochrome $c \rightarrow O_2$; car *a*) la possibilité de l'existence d'une autre voie enzymatique qui court-circuiterait le cytochrome c doit être prise en considération (STOTZ, 1942), surtout chez les microorganismes (cf. TAMIYA, 1942) ; *b*) l'oxydation peut être due à une catalyse non enzymatique, par des complexes de Cu, par exemple (PONGRATZ, 1950).

Le test manométrique de l'activité de l'indophénol-oxydase a été effectué selon la technique de KEILIN (1929). Les résultats sont donnés par le tableau XV, qui permet de voir que les « petites » n'oxydent pas le réactif, tandis que les « grandes » l'oxydent avec la même vitesse que la levure de boulangerie du commerce.

TABLEAU XV

Oxydation du diméthyle paraphénylènediamine (ppd) par des cellules intactes.

Levure cultivée pendant 3 j. ; mode I ; milieu 1g.

Tampon phosphate 0,067 M ; pH 7,4 ; 2 cm³ de suspension de levure à 5 % (ph/v) chauffée pendant 90 min. à 50° C. ; ppd 0,024 M additionnée au temps 0.

Les valeurs d'absorption d'O₂ sont indiquées en mm³ :

Colonne 1 : en absence de levure.

Colonne 2 : en absence de ppd.

Colonne 3 : en présence de ppd.

Colonne D: oxydation de ppd = colonne 3 — (2 + 1).

Temps en minutes	Témoin	Levure de boulangerie du commerce			B II			59 R			59 RA			59 Rp		
	I	2	3	D	2	3	D	2	3	D	2	2	D	2	3	D
15	0	10	60	50	19	72	54	21	74	53	0	3	2	0	1	1
30	1	21	113	90	41	134	95	40	136	95	0	4	3	0	5	4
45	2	30	154	122	59	181	125	59	186	125	1	6	4	0	9	7

Ces résultats sont confirmés par la réaction du « Nadi » où l'on observe la vitesse de formation du bleu d'indophénol. Cette réaction, effectuée selon la technique de KEILIN (1929), est toujours complètement négative chez les « petites » et positive chez les « grandes ».

Ces observations ont été étendues à une centaine de souches haploïdes et diploïdes, « grandes » et « petites », isolées à partir de

« Boulangerie II », ou de « Yeast Foam », ainsi qu'à quelques souches issues des croisements des précédentes. Sur toutes ces souches, nous avons effectué à la fois la détermination de la respiration et de la fermentation aérobie en présence de glucose (§ 3.213) et la réaction du Nadi. En outre, un certain nombre de souches ont été soumises à l'examen spectroscopique. Toutes les souches qui, d'après les données manométriques ou spectroscopiques, ont été classées comme « petites », ont donné une réaction du Nadi complètement négative ⁽¹⁾.

3.342. ETUDE DES PRÉPARATIONS NON-CELLULAIRES

La démonstration de l'activité de la cytochrome-oxydase (enzyme défini par KEILIN et HARTREE (1938) comme oxydant, à l'aide de l'oxygène atmosphérique, le cytochrome *c* réduit) semble être plus difficile dans les préparations de levure dépourvues de cellules que dans celles préparées à partir de tissus animaux. Bien que la grande intensité respiratoire de la levure et la rapidité avec laquelle elle oxyde son propre cytochrome *c in situ* suggère qu'il devrait être facile d'extraire l'enzyme et de le tester *in vitro*, KEILIN (1929) n'a pas pu obtenir de préparations non-cellulaires à activité indophénoloxydasique. La même difficulté a été rencontrée par STIER et CASTOR (1941) et ce fait les a empêchés de conclure, de façon sûre, à l'absence de cytochrome-oxydase dans la levure résistante au KCN qu'ils ont étudiée. KEILIN et HARPLEY (1941) ont pu démontrer l'activité de l'oxydase succinique (qui comporte l'intervention de la cytochrome-oxydase) dans une préparation de levures partiellement brisées, mais les données publiées par ces auteurs ne permettent pas d'exclure la possibilité que cette activité était liée aux cellules dont l'intégrité n'était pas affectée par le traitement. Seul CHANTRENNE (1943), faisant appel à une microméthode, réussit à mettre en évidence une certaine activité cytochrome-oxydasique dans des broyats de levure dépourvus des cellules intactes, mais les résultats publiés par cet auteur ne permettent pas de se prononcer sur la valeur physiologique de la réaction.

Le premier problème qui se posait était donc de trouver une technique d'extraction de la cytochrome-oxydase, telle que la prépara-

⁽¹⁾ M. EPHRUSSI (communication personnelle) a trouvé récemment une souche qui, tout en gardant le pouvoir de respirer le sucre et présentant le spectre typique des « grandes », donne une réaction Nadi négative. L'étude plus approfondie de cette souche, où la non formation du bleu d'indophénol ne semble pas être due à une déficience du système WARBURG-KEILIN, peut se révéler très fructueuse.

tion obtenue soit suffisamment active pour permettre, non seulement l'étude *in vitro*, mais encore pour préciser l'importance du système dans les conditions physiologiques. Le deuxième problème était de choisir parmi les diverses méthodes employées pour mesurer l'activité de la cytochrome-oxydase, celle qui convenait le mieux.

Des expériences préliminaires ont montré qu'un certain nombre de préparations enzymatiques (autolysats de levure, levure séchée à la température du laboratoire ou à 0° et sous vide, levure séchée à l'acétone et levure plasmolysée par addition de NaCl) donnaient des préparations à activité cytochrome-oxydasique très faible ou nulle. Par contre, les cellules brisées mécaniquement à froid libéraient des quantités appréciables d'enzyme. Nous avons donc adopté le procédé d'extraction décrit dans le paragraphe 2.71.

Les « broyats » ainsi obtenus montrent une activité cytochrome-oxydasique très nette, mais les déterminations exactes sont gênées par la respiration endogène considérable (cf. § 3.33), due sans doute à la présence de nombreux substrats, car elle disparaît complètement après 24 heures de dialyse. Un certain nombre d'expériences ont été effectuées sur les « broyats » dialysés, mais un procédé plus simple a été adopté par la suite. On verra dans le paragraphe 3.36 que la totalité de l'activité de la cytochrome-oxydase est liée à la fraction du broyat qui est sédimentée par centrifugation à 25.000 G pendant 60 minutes. Cette fraction, que nous appelons « fraction G », non dialysée, ne présente qu'une respiration endogène négligeable, et se prête, à notre avis, à l'étude de la cytochrome-oxydase aussi bien que la préparation classique de KEILIN et HARTREE (1938-1947) à partir du muscle cardiaque.

Les méthodes généralement employées pour mesurer la cytochrome-oxydase peuvent être divisées en 1) méthodes spectrophotométriques, où l'oxydation du cytochrome *c* ajouté à l'état réduit est suivie au moyen des variations de l'extinction à 550 mμ (ALBAUM et coll., 1946) ; 2) méthodes manométriques (KEILIN et HARTREE, 1938 ; HAAS, 1943 ; SLATER, 1949 *a*) où l'on mesure la consommation d'oxygène par le système :

corps réducteur $\longrightarrow$ cytochrome *c* $\longrightarrow$ cytochrome-oxydase $\longrightarrow$ O₂

3) méthodes colorimétriques, où la vitesse d'oxydation dans le même système est inférée de la vitesse de formation de la forme oxydée du colorant qui sert à réduire le cytochrome *c* (SMITH et STOTZ, 1949). Nous avons employé presque exclusivement des méthodes manométriques en nous fondant surtout sur l'étude de SLATER (1949 *a*) de la cytochrome-oxydase du muscle.

3.3421. Détermination de la cytochrome-oxydase

Comme l'indique la figure 14, la « fraction G » du broyat de 59 R montre une activité cytochrome-oxydasique très nette. En effet, la consommation d'oxygène par le système incomplet (ascorbate + fraction G, ascorbate + cytochrome *c*, cytochrome *c* +

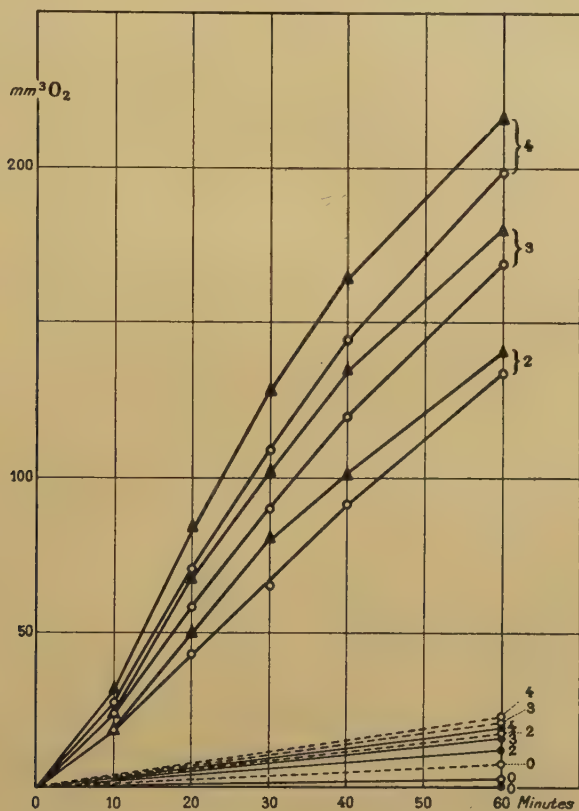


Fig. 14. — Comparaison de l'activité de la cytochrome-oxydase des broyats des souches 59 R et 59 RA.

Ascorbate 0,017 M ; NaCl 0,011 M ; pH final 6, 8-6, 9 ; 37°.

Courbes — 0 : pas de cyt. *c* ajouté ; 2 : $1,84 \times 10^{-5}$ M ; 3 : $2,75 \times 10^{-5}$ M ; 4 : $3,66 \times 10^{-5}$ M.

Traits plein, cercles : 0,3 cc. de fract. G du broyat de 59 R contenant 0,264 mg N.

Points : 0,3 cc. de fract. G du broyat de 59 RA contenant 0,338 mg N.

Triangles : 0,3 cc. de fract. G de 59 R et 0,3 cc. de fract. G de 59 RA.

Trait pointillé : pas de broyat.

fraction G) est inférieure à 10 % de la consommation d'oxygène par le système complet : ascorbate + cytochrome *c* + fraction G. L'absorption d'oxygène est stimulée par l'addition de quantités croissantes de cytochrome *c* ; la vitesse maxima est constante entre la 10^e et la 30^e minute après l'addition de l'ascorbate.

Afin de déterminer quantitativement l'activité de la cytochrome-oxydase, nous avons procédé de la façon suivante. Après 15 minutes d'équilibration thermique à vitesse d'oscillation réduite, l'acide ascorbique fraîchement neutralisé et placé dans le diverticule de la fiole manométrique est mélangé avec le cytochrome *c* et l'oxydase placés dans le compartiment principal. L'absorption d'O₂ est mesurée toutes les 10 minutes et la vitesse maxima est calculée dans l'intervalle 10-30 minutes.

Appelons *R* la vitesse brute des réactions du système complet, et *r* la vitesse, mesurée séparément, de la consommation d'oxygène par le système dépourvu de « fraction G ». La vitesse nette, due à la présence de l'oxydase, sera $V = R - r$. Cependant, il faut noter que cette soustraction n'est valable que si l'oxydation non enzymatique du corps autoxydable n'est pas influencée par l'addition de l'enzyme. L'application d'un procédé dû à SCHNEIDER et POTTER (1943) nous a permis de voir qu'il en est bien ainsi. La concentration en cytochrome *c* étant fixe, nous avons fait varier la quantité de cytochrome-oxydase et extrapolé les valeurs obtenues pour la quantité d'enzyme nulle. La valeur de *r* ainsi obtenue a été sensiblement la même que celle trouvée dans le test témoin : ascorbate + cytochrome *c*. Comme l'a déjà fait remarquer SLATER (1949 *a*), il est important que les valeurs de *r* soient déterminées avec les solutions mêmes qui ont servi à mesurer *R*, car les résultats varient selon les préparations du tampon phosphate, ce qui est vraisemblablement dû à la présence d'ions de métaux lourds ⁽¹⁾.

L'absorption d'O₂ par la cytochrome-oxydase + ascorbate, en absence de cytochrome *c* ajouté, est, comme le montre la figure 14, très faible ($< 4\%$ de la vitesse en présence de cytochrome *c* $1,38 \times 10^{-5}$ M, qui est la concentration la plus faible employée dans nos expériences) ; les valeurs de *V* indiquées ne sont pas corrigées pour ce facteur.

3.3422. *L'influence du pH sur l'activité de la cytochrome-oxydase*

La figure 15 montre l'activité de la cytochrome-oxydase de 59 R en fonction du pH. On constate l'existence d'un optimum net

⁽¹⁾ Dans nos expériences, toutes les solutions sont préparées dans l'eau bidistillée sur pyrex.

entre pH 6,6 et 6,8. Cet optimum est déplacé vers le côté acide par comparaison avec l'optimum généralement trouvé pour le même enzyme préparé à partir de tissus animaux (env. 7,1 - 7,4). Ceci peut être dû à ce que le pH intracellulaire global de la levure est aux environs de 6,0 (CONWAY et coll., 1950), c'est-à-dire plus acide que celui des tissus animaux. Toutes les déterminations ont donc été effectuées à pH 6,8 - 6,9.

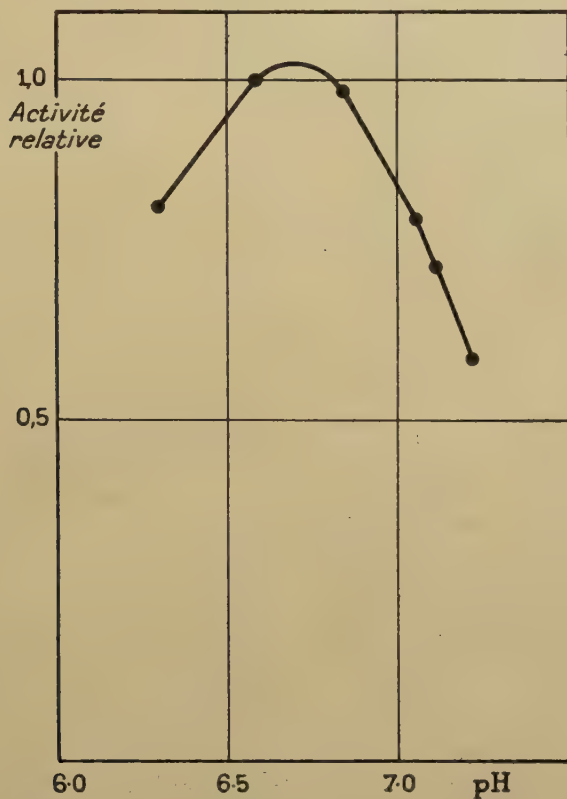


Fig. 15. — *Activité de la cytochrome-oxydase en fonction du pH.*

Ascorbate 0,017 M ; cytochrome *c* $2,75 \times 10^{-5}$ M ;
NaCl 0,011 M ; tampon phosphate 0,064 M ;
37° ; 0,3 cm³ de la fraction G du broyat de 59 R
ayant $Q_{O_2}^{cyt. o} = 538$ à pH 6,59.

3.3423. *Influence du temps de conservation sur l'activité de la cytochrome-oxydase*

La figure 16 montre que, même à 0 - 4°, la fraction G du broyat perd rapidement son activité cytochrome-oxydasique. Après un

mois de conservation à froid, la préparation est totalement inactivée. Au moins au début cette perte d'activité n'est pas due au développement de bactéries, car l'examen bactériologique des préparations âgées de 3 jours a montré qu'elles étaient pratiquement stériles. Les mesures étaient donc généralement effectuées sur des préparations âgées de 24 heures au plus.

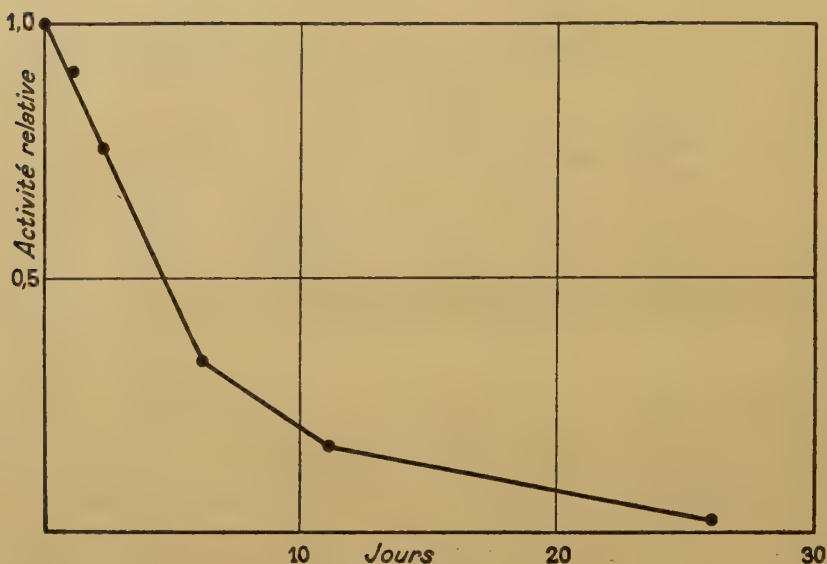


Fig. 16. — Perte de l'activité de la cytochrome-oxydase au cours de la conservation à la glace (0-4°).

Ascorbate 0,017 M; cytochrome *c* $3,66 \times 10^{-5}$ M; NaCl 0,011 M; tampon phosphate 0,064 M; pH 6,9; 37°; 0,3 cc. de la fraction G du broyat de 59 R dont le $Q_{O_2}^{cyt. c}$ (N) était = 1675 au départ.

Plusieurs auteurs ont déjà observé un phénomène analogue avec des préparations du muscle cardiaque. BOREI (1950) a étudié les conditions de l'inactivation et attribue celle-ci à des altérations de la structure colloïdale qui empêcheraient l'accessibilité mutuelle des constituants du système.

3.3424. Influence de la concentration du cytochrome *c* sur l'activité de la cytochrome-oxydase

La figure 14 permettait déjà de constater que l'absorption d'oxygène d'un système complet est stimulée par l'addition de quantités croissantes de cytochrome *c*. Cette stimulation est encore plus manifeste dans la figure 17 où la vitesse maxima ($V = R - r$) est expri-

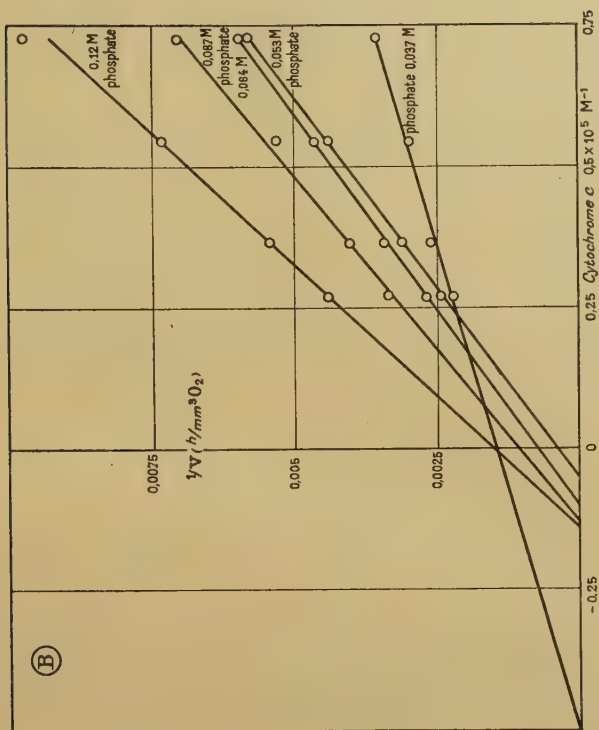
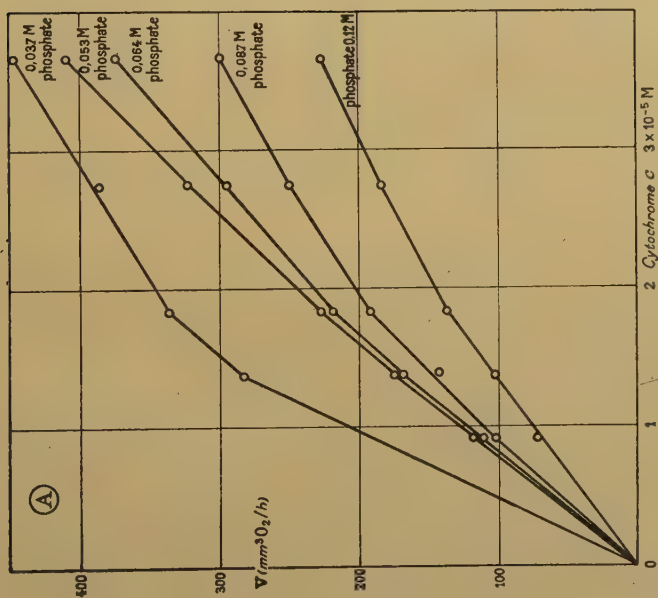


Fig. 17. — *Activité de la cytochrome-oxydase en fonction de la concentration du cytochrome c ajouté.*

Figure A : Ascorbate 0,017 M ; NaCl 0,011 M ; pH final 6,8-6,9 ; 37° ; 0,3 cc. de la fraction G du broyat de 59 R contenant 0,410 mg N.

Figure B : Données de la figure A exprimées selon LINeweaver et Burk (1934).

mée en fonction de la concentration du cytochrome *c*. La figure 17 B montre cette relation représentée selon LINEWEAVER et BURK (1934) : l'inverse de la concentration en abscisse et l'inverse de la vitesse en ordonnée. La relation est linéaire, ce qui permet d'extrapoler à la concentration infinie du cytochrome *c*. Ceci est effectué par ajustement des droites de régression selon la méthode des moindres carrés. On constate que les quantités de cytochrome *c* ajouté, requises pour saturer la cytochrome-oxydase, sont très élevées : pour obtenir par exemple une activité égale à 90 % (à la concentration de phosphate = 0,120 M) de celle calculée pour la concentration infinie, il aurait fallu ajouter 30 mg de cytochrome *c* par fiole, ce qui représente environ 20 fois plus que la quantité effectivement utilisée.

3.3425. *Influence de la concentration du tampon phosphate sur l'activité de la cytochrome-oxydase*

L'expérience dont les résultats sont représentés par la figure 17 a été effectuée avec diverses concentrations de tampon phosphate. La figure 17 montre que ce tampon a une importance capitale pour l'activité cytochrome-oxydasique. Pour une concentration donnée de cytochrome *c* (comprise entre 0,9 et $3,7 \times 10^{-5}$ M), l'activité augmente inversement à la concentration en phosphate, tandis que la pente des droites de régression diminue. Il en résulte que l'activité, obtenue par extrapolation à une concentration infinie du cytochrome *c*, passe par un maximum très prononcé, situé à 0,053 M (tableau XVI). Il en est de même pour la concentration du cytochrome *c* qui donne une vitesse d'oxydation égale à 1/2 de la vitesse à la concentration de saturation, et pour le rapport entre l'activité à la saturation et l'activité à une concentration donnée de cytochrome *c*.

La cytochrome-oxydase de la levure se comporte donc vis-à-vis du cytochrome *c* et du phosphate comme celle des tissus animaux. SLATER (1949 *a*), SMITH et STOTZ (1949) et RILEY (1950) ont trouvé que l'activité de leurs préparations était fortement influencée par la concentration des sels et que l'optimum était situé entre la molarité 0,05 et 0,07, valeurs qui concordent bien avec nos estimations. La comparaison des données de SLATER (*l. c.*) avec les nôtres fait apparaître que les quantités de cytochrome *c* requises pour saturer l'enzyme de la levure sont supérieures à celles nécessaires dans le cas du muscle cardiaque. Il est d'autre part intéressant de noter que dans nos expériences la concentration de cytochrome *c* qui donne une demi saturation du système complet présente un

TABLEAU XVI

Activité de la cytochrome-oxydase en fonction de la concentration du tampon phosphate.

Concentration du phosphate	(A)	(B)	$\frac{(B)}{(A)} \times 100$	$(\text{cyt. } c)_{\frac{1}{2}}$
	$Q_{O_2}^{\text{cyt. } c} (N)$ à la concentr. infinie du cyt. c	$Q_{O_2}^{\text{cyt. } c} (N)$ à la concentr. $3,66 \times 10^{-5} M$ du cyt. c		
0,037 M	1705	1175	69	$2,0 \times 10^{-5} M$
0,053 M	5830	995	17	$17 \times 10^{-5} M$
0,064 M	3160	917	29	$9,2 \times 10^{-5} M$
0,087 M	2320	730	32	$7,5 \times 10^{-5} M$
0,120 M	1635	554	34	$7,8 \times 10^{-5} M$

Voir légende de la figure 17.

maximum très prononcé à la concentration de phosphate = 0,053 M, alors que dans le muscle cardiaque elle augmente graduellement entre 0,01 et 0,15 M (SLATER, *l. c.*). En outre, d'après cet auteur, la valeur de $(\text{cyt. } c)_{\frac{1}{2}}$ est considérablement influencée par le changement de la quantité de cytochrome-oxydase employée dans le test, tandis que ce n'est apparemment pas le cas chez la levure. Il est possible que ces différences soient dues au fait que les préparations de l'oxydase de la levure contiennent très peu de cytochrome c endogène ($< 0,3 \times 10^{-9}$ mole/mg N), et beaucoup moins que les préparations habituelles du muscle cardiaque (env. 5×10^{-9} moles/mg N, SLATER, 1949 d).

3.3426. *Influence de la quantité de broyat sur l'activité de la cytochrome-oxydase*

Le tableau XVII montre le résultat des mesures effectuées avec deux quantités différentes de « fraction G ». On constate que lorsque la quantité de cytochrome-oxydase est doublée, la vitesse maxima de la consommation d' O_2 , en présence d'une concentration donnée de cytochrome c , est doublée également. La pente de la droite de régression, construite selon la méthode de LINEWEAVER et BURK (1934), est diminuée de moitié, de sorte que les valeurs du $Q_{O_2}^{\text{cyt. } c}$ restent sensiblement inchangées. Les valeurs de $(\text{cyt. } c)_{\frac{1}{2}}$ ne semblent pas être influencées lorsqu'on fait varier la quantité de cytochrome-oxydase.

TABLEAU XVII

Activité de la cytochrome-oxydase en fonction de la quantité d'enzyme.

Cytochrome <i>c</i>	mm ³ O ₂ /h							
	0,15 cm ³ de broyat				0,30 cm ³ de broyat			
	R	r	R-r=V	Q _{O₂} ^{cyt. c} (N)	R	r	R-r=V	Q _{O₂} ^{cyt. c} (N)
1,375 × 10 ⁻⁵ M	78,1	17,6	60,5	675				
1,835 × 10 ⁻⁵ M	101,4	18,6	82,8	924	182,2	18,6	163,6	912
2,75 × 10 ⁻⁵ M	137,3	21,1	116,2	1.300	269,3	21,1	248,2	1.386
3,66 × 10 ⁻⁵ M	172,5	22,1	150,4	1.676	322,3	22,1	300,2	1.675
∞			1.430	16.000			3.290	18.300

Ascorbate 0,017 M ; NaCl 0,011 M ; tampon phosphate 0,064 M ; pH 6,8-6,9 ; 37° ; fraction G du broyat de 59 R.

3.3427. *Comparaison de l'activité de la cytochrome-oxydase des souches 59 R et 59 RA*

Nous pouvons maintenant comparer l'activité de la cytochrome-oxydase des souches 59 R et 59 RA. La figure 14 montre que la fraction G obtenue à partir du broyat des « petites » est totalement dépourvue de cette activité. En effet, l'addition de la fraction G de 59 RA au système ascorbate-cytochrome *c*, loin de stimuler la vitesse de consommation d'O₂, la diminue légèrement. Cette diminution se retrouve constamment quelle que soit la concentration du cytochrome *c* ajouté, de sorte que la valeur de $V^{\text{cyt. } c \infty}$ est légèrement négative.

Cette absence d'activité est-elle due à la présence d'un inhibiteur dans la fraction G des « petites » ?

Pour répondre à cette question, nous avons effectué l'expérience suivante : l'activité cytochrome-oxydasique a été déterminée simultanément dans les « fractions G » de 59 R et de 59 RA et dans le mélange à parties égales des deux fractions. Si un inhibiteur était présent dans la préparation de 59 RA, il devrait diminuer la consommation d'O₂ dans les fioles contenant le mélange. Les résultats montrent clairement qu'il n'en est rien (fig. 14). L'activité du mélange est en fait de 15 à 20 % supérieure à celle de la « fraction G » de 59 R seule. Le manque d'activité dans la « fraction G » de 59 RA est donc dû à l'absence de l'enzyme.

La diminution de la consommation d'oxygène qui suit l'addition

de la « fraction G » de 59 RA au système ascorbate + cytochrome *c* est vraisemblablement due au fait que les protéines introduites se combinent par leurs groupes SH avec les métaux lourds (Cu^{++}) qui catalysent l'autoxydation de l'ascorbate (cf. BARRON et coll., 1935-1936). Dans le cas de la « fraction G », cette diminution est très faible, tandis que, pour le « broyat » entier des « petites », elle est plus considérable et peut représenter 60 % de l'autoxydation. La légère stimulation de l'activité de la cytochrome-oxydase de 59 R, observée après addition de la « fraction G » de 59 RA s'explique à la lumière des travaux de KEILIN et HARTREE (1947-1949) et de BOREI (1950) qui ont montré que l'addition de protéines augmente généralement l'activité cytochrome-oxydasique.

Nous avons aussi vérifié que la cytochrome-oxydase était absente des « broyats » non fractionnés de 59 RA et qu'elle ne se trouvait pas dans les débris cellulaires éliminés au cours de la préparation du « broyat ». *Il est donc évident qu'elle n'existe pas chez le mutant.* Le tableau XVIII résume la comparaison des deux souches.

TABEAU XVIII

Comparaison des activités de la cytochrome-oxydase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R							59 RA						
Fract. G du broyat	cyt. <i>c</i> $3,66 \times 10^{-5}$ M			cyt. <i>c</i> ∞ M			Fract. G du broyat	cyt. <i>c</i> $3,66 \times 10^{-5}$ M			cyt. <i>c</i> ∞ M		
	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> RO_2	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> RO_2		cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> RO_2	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> QO_2	cyt. <i>c</i> RO_2
	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)		(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)
C ₁	1250	917	132	4310	3160	456	C ₄	o		o	o		o
C ₂	1000	1675	120	10200	17200	1230	C ₅	o		o	o		o
C ₃	570	649	73,5	3570	4065	460	D ₂₈	o		o	o		o
D ₂₀	758	862	227	1880	2140	563							
Moyenne			138			677				o			o

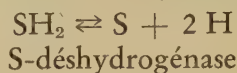
Ascorbate 0,017 M ; NaCl 0,011 M ; pH 6,9 ; 0,3 cm³ de fraction G ; tampon phosphate 0,064 M ; 37°.

3.35. Les systèmes enzymatiques réduisant le cytochrome *c*

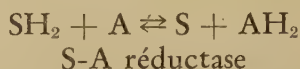
Le cytochrome *c* peut être réduit par diverses réactions enzymatiques. Avant de comparer l'activité de certaines d'entre elles chez les « grandes » et chez les « petites », il nous semble nécessaire de

faire deux remarques concernant la nomenclature des enzymes en question et la manière d'exprimer leur activité.

1) Le terme *déshydrogénase* est réservé aux enzymes qui catalysent le départ de deux atomes d'hydrogène du substrat :



Cependant, les tests employés pour mesurer l'activité de ces enzymes ne reposent que rarement sur la vitesse de disparition de SH_2 ou sur la vitesse d'accumulation de S. Presque toujours on fait appel à des méthodes qui reposent sur la vitesse de réduction d'un accepteur d'hydrogène :



Or, dans une telle réaction, le système de catalyseurs est généralement plus complexe que dans la première et la vitesse de la réaction globale dépend de la nature et de la concentration de l'accepteur. Certains accepteurs, tels que le bleu de méthylène ou le cytochrome c, requièrent, en plus de déshydrogénase spécifique, la présence de catalyseurs supplémentaires. Il est évident que, dans ces conditions, on n'a pas le droit de tirer des conclusions quant à la déshydrogénase seule, car la vitesse de la réaction globale peut être limitée par des catalyseurs intermédiaires. C'est pourquoi nous préférons employer des termes descriptifs tels que *lactico-BM réductase*, par exemple, le terme de lactico-déshydrogénase étant réservé au premier enzyme du système activant le lactate.

2) Lorsqu'il s'agit de comparer deux souches de levure, ce qui importe avant tout, c'est l'activité des cellules intactes. Celle-ci ne peut pas être mesurée directement, mais on peut la déduire des mesures effectuées sur des extraits. Pour cela on doit rapporter l'activité mesurée *in vitro* à la quantité de « matériel actif » (cf. § 2.4) qui a servi à préparer l'extrait et non pas à la quantité de « matériel actif » contenu dans l'extrait, comme on le fait couramment. La comparaison des tableaux XX et XXI montre la différence entre les résultats obtenus par ces deux modes de calcul. On y voit que les valeurs du $Q_{\text{BM}}^{\text{lactate}}$ (N) sont du même ordre de grandeur pour les autolysats et pour les broyats de 59 R. Autrement dit, les deux préparations non-cellulaires ont sensiblement, par rapport à leur concentration en protéines, la même teneur en enzyme. Cependant la quantité totale d'enzyme extrait de la même quantité de cellules, $R_{\text{BM}}^{\text{lactate}}$ (N), est environ 20 fois plus grande dans le cas des broyats.

Le tableau XIX donne quelques valeurs de R que nous avons calculées à partir des données publiées par divers auteurs. Elles sont généralement beaucoup plus faibles que celles trouvées dans le présent travail.

Toutes les expériences décrites dans ce paragraphe portent sur les levures cultivées pendant 3 jours dans le milieu 1g, mode I.

TABLEAU XIX

	BERNHEIM 1928	FODOR et FRANKEN- THAL 1932	BOYLAND 1933	BACH et coll. 1946	MULLER 1933- 1934	ce travail
$R_{BM}^{lact.}$ (N)	1 à 2	env. 5	env. 5	20 à 40	—	12 - apozymase ⁽¹⁾ 3 - jus de Lebedeff 30 - broyat
R_{BM}^{alcool} (N)	—	—	—	—	env. 1	100 - broyat
R_{BM}^{malate} (N)	—	env. 10	—	—	—	350 - broyat

3.351. LACTICO-BM RÉDUCTASE ET LACTICO-CYTOCHROME *c* RÉDUCTASE

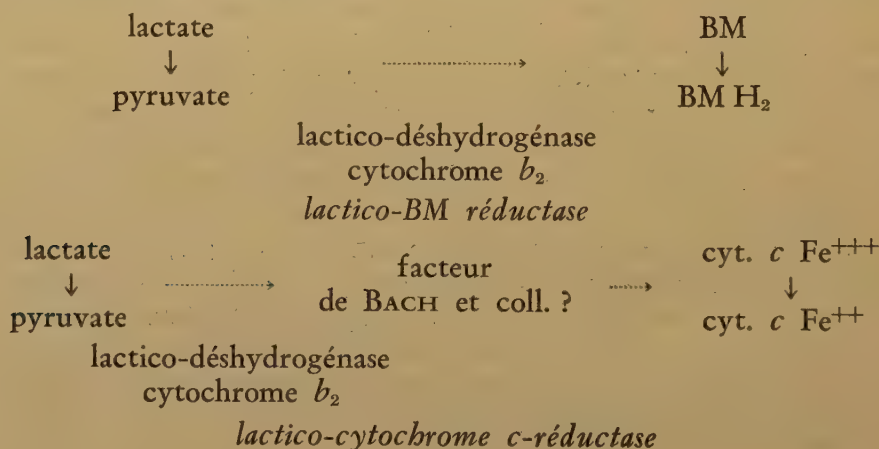
Le système enzymatique de la levure qui oxyde l'acide lactique a fait l'objet de plusieurs travaux. Après la démonstration que les cellules intactes de la levure de boulangerie respirent le lactate (FÜRTH et LIEBEN, 1922 ; MEYERHOF, 1925 ; MEYERHOF et LOHMAN, 1926), BERNHEIM (1928) a réussi à extraire l'enzyme responsable de la réaction lactate + BM $\rightarrow$ pyruvate + leuco BM. Cet enzyme a été nommé déshydrogénase lactique, et BOYLAND et BOYLAND (1934), ainsi que ADLER et MICHAELIS (1935) ont montré que la présence des coenzymes I et II n'est pas nécessaire à son activité. Il est spécifique pour les α -hydroxyacides et son activité diminue très rapidement avec l'allongement de la chaîne des carbones (BERNHEIM, *l. c.*). L'enzyme a été purifié environ 1000 fois par BACH et coll. (1946), mais son instabilité a empêché ces auteurs de pousser l'isolement jusqu'au bout. Ils ont pu constater néanmoins certains faits très importants relatifs au mécanisme de la réaction. Au cours de la purification, l'activité de l'enzyme, mesurée par la réduction du BM, a évolué parallèlement à la concentration d'un nouveau cytochrome (b_2 , bande α à 556,5 m μ) dont la réduction par le lactate, ainsi que l'oxydation par le système

(¹) Préparée selon LENNERSTRAND (1936).

cytochrome *c*-cytochrome-oxydase, peuvent être observées spectroscopiquement. Le cytochrome *b*₂ représente donc un constituant du système lactate $\rightarrow$ BM et lactate $\rightarrow$ cytochrome *c*. Il est impossible, à l'heure actuelle, de dire s'il est identique à la déshydrogénase ou s'il représente un intermédiaire dont la concentration limite la vitesse de la réaction globale. Un autre point intéressant est la mise en évidence d'un facteur supplémentaire qui s'intercale entre les cytochromes *b*₂ et *c*. Les préparations brutes de lactico-déshydrogénase réduisaient aussi bien le BM que le cytochrome *c*, tandis que certaines préparations purifiées étaient inactives envers le cytochrome *c*, tout en gardant leur activité envers le BM. La nature de ce facteur demeure inconnue, mais il ne semble pas qu'il soit apparenté aux flavines.

L'oxydation de l'acide lactique obéit donc chez la levure à un mécanisme entièrement différent de celui des tissus animaux où la déshydrogénase lactique réduit le CoI qui, à son tour, peut réduire le BM ou le cytochrome *c* par l'intermédiaire de la diaphorase ou de la Co I-cytochrome *c*-réductase. L'enzyme des tissus animaux, cristallisé par STRAUB (1940) et KUBOWITZ et OTT (1944), ne montre pas de spectre héminique.

Comme nous avons vu dans le paragraphe 3.22, les cellules intactes des « grandes » respirent le lactate avec un Q_{O₂} du même ordre de grandeur que celui qui caractérise la respiration du glucose ou du pyruvate, tandis que les « petites » ne le respirent qu'avec une vitesse très faible. Il en est de même pour le broyat (§ 3.33). Pour comparer l'activité spécifique de la déshydrogénase lactique des deux souches, nous avons eu recours aux mesures de la vitesse de réduction du BM et du cytochrome *c*. Les deux systèmes peuvent être schématisés comme suit :



Un certain nombre d'expériences préliminaires s'imposait. La figure 18 montre la relation entre le pH et l'activité de la lactico-BM réductase dans le broyat et dans le jus de Lebedeff. Dans les deux cas, un optimum a été trouvé à pH 5,3, très voisin de celui trouvé par BACH et coll. (1946) pour l'enzyme purifié (5,2) et par BOYLAND et BOYLAND (1934) pour la zymine lavée (5,6). La figure 18 montre également que les valeurs des blancs, c'est-à-dire les activités en absence d'enzyme ou de lactate, sont parfaitement négligeables : elles représentent $< 1\%$ de l'activité du système complet.

La figure 18 montre également l'activité du même broyat des

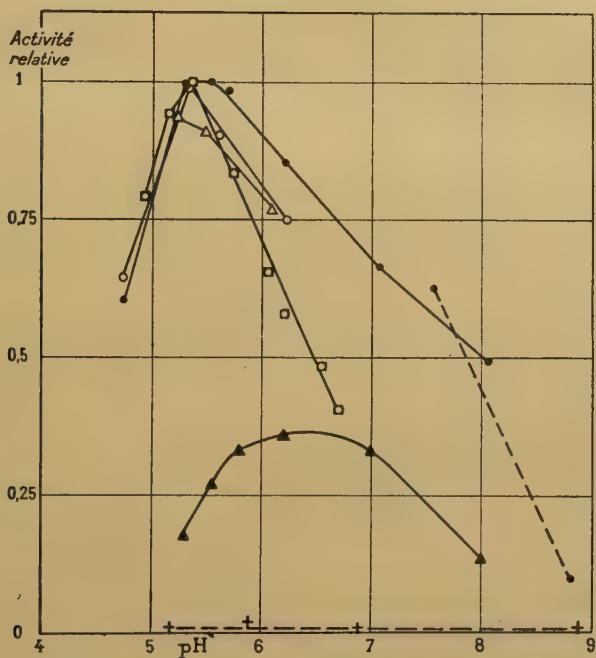


Fig. 18. — *Activité de la lactico-BM-réductase en fonction du pH.*

Points : broyat dialysé de 59 R à $Q_{BM}^{lact.} = 337$;
 dl-lactate 0,06 M ; KCN 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ;
 tampon 0,06 M ; trait plein : phosphate ; trait poin-
 tillé : borate ; triangles pleins : idem, sans KCN ;
 cercles : broyat dialysé de 59 RA à $Q_{BM}^{lact.} = 259$;
 triangles : idem, sans KCN ; croix : comme points,
 mais sans lactate ; carrés : jus de Lebedeff dialysé
 de 59 R à $Q_{BM}^{lact.} = 55$; dl-lactate 0,06 M ; BM $6,3 \times 10^{-5}$ M ;
 tampon phosphate 0,1 M.

« grandes » en absence et en présence de cyanure. En absence de KCN, l'activité est beaucoup plus faible et l'optimum de pH est déplacé vers l'alcalinité. Dans le jus de macération et dans le broyat des « petites », au contraire, l'addition du cyanure n'augmente pas l'activité et n'affecte pas de façon significative l'optimum de pH. Il semble donc que le KCN élimine un inhibiteur de la réduction du BM présent dans le broyat des « grandes », mais absent du jus de Lebedeff et du broyat des « petites ». L'explication la plus simple consisterait à considérer le produit d'oxydation, c'est-à-dire l'acide pyruvique, comme l'inhibiteur. BERNHEIM (1928) a,

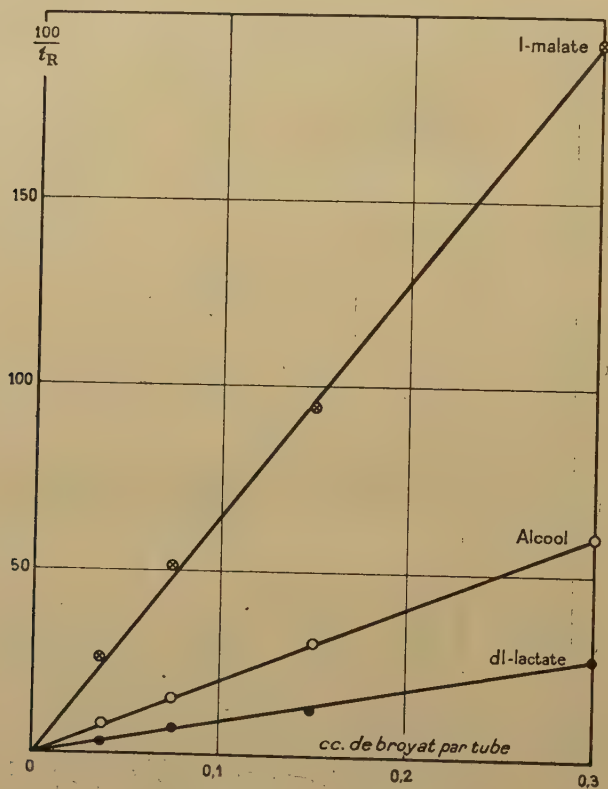


Fig. 19. — Vitesse de réduction du BM par le lactate, malate et l'alcool en fonction de la quantité d'enzyme.

Substrat 0,06 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; broyat dialysé de 59 R. Points : KCN 0,03 M ; pH 5,3. Cercles : semi-carbazide $0,03 \times 10^{-5}$ M ; pH 8,0. Croix : KCN 0,03 M ; Col $2,5 \times 10^{-5}$ M ; pH 8,9.

en effet, trouvé que le pyruvate, à des concentrations $\geq 10^{-2}$ M, inhibe complètement la décoloration du BM. Pourtant, l'adoption de cette explication est gênée par les faits suivants : 1) la concentration du pyruvate formé dans nos expériences doit être très faible (env. 10^{-4} M après la réduction complète du BM) ; 2) il doit se former aussi bien dans les autolysats que dans les broyats des deux souches. La destruction rapide du pyruvate (due par ex. à la carboxylase) dans le jus de macération et dans le broyat des « petites » pourrait rendre compte de la différence dans le comportement de ces préparations. Il est intéressant de noter que BOYLAND et BOYLAND (1934) ont trouvé que la lactico-BM-réductase de la zymine présente un optimum d'activité à pH 5,6, tandis que l'enzyme obtenu par extraction avec Na_2HPO_4 présente un optimum à 6,2, comme notre broyat des « grandes » sans KCN. Etant donné que les expériences de ces auteurs étaient faites sans addition de cyanure, il est possible que le même phénomène soit à l'origine des différences des optima trouvés dans leur travail et dans le nôtre. En présence de KCN, les optima de pH des broyats des souches 59 R et 59 RA se sont révélés identiques et toutes les expériences dont il sera question maintenant ont été effectuées à pH 5,3.

La figure 19 montre que la relation entre la quantité de broyat et l'activité est linéaire dans un large intervalle de concentrations. Ceci est vrai, qu'il s'agisse du broyat des « petites » ou des jus de macération.

La figure 20 montre la perte de l'activité du broyat dialysé au cours de la conservation à 0-4°. L'activité du broyat reste intacte pendant 30 heures au moins. Toutes nos mesures ont été effectuées pendant les premières 24 heures.

Ces expériences préliminaires ont rendu possible la comparaison des activités spécifiques des préparations faites à partir des souches normale et mutante. Les tableaux XX et XXI donnent les résultats des expériences, chaque point représentant une détermination indépendante, réalisée sur des cultures différentes. Ils montrent que les valeurs du $Q_{\text{BM}}^{\text{lactate}}$ ainsi que du $R_{\text{BM}}^{\text{lactate}}$ (N) des deux souches sont tout à fait similaires pour les broyats et les autolysats ⁽¹⁾. Les

(¹) Dans un travail préliminaire (SLONIMSKI et EPHRUSSI, 1949), nous avons trouvé que le broyat des « petites » réduisait le BM plus vite que le broyat des « grandes ». Les mesures étaient effectuées sur des broyats non dialysés et en absence de KCN. A la lumière des résultats cités plus haut, il est clair que la différence était due à la présence d'un inhibiteur dans le broyat de 59 R, et non à la différence dans la quantité de lactico-BM réductase. Cet exemple montre comme il est parfois difficile d'interpréter les résultats des mesures d'activité en termes de teneur enzymatique.

valeurs du $R_{BM}^{lactate}$ (N) sont beaucoup plus élevées dans les broyats, et, comme nous l'avons souligné plus haut, cette remarque est valable pour tous les enzymes respiratoires testés dans ce travail. Ceci résulte sans doute du fait que l'autolyse ne libère qu'une faible partie de l'enzyme contenu dans la cellule.

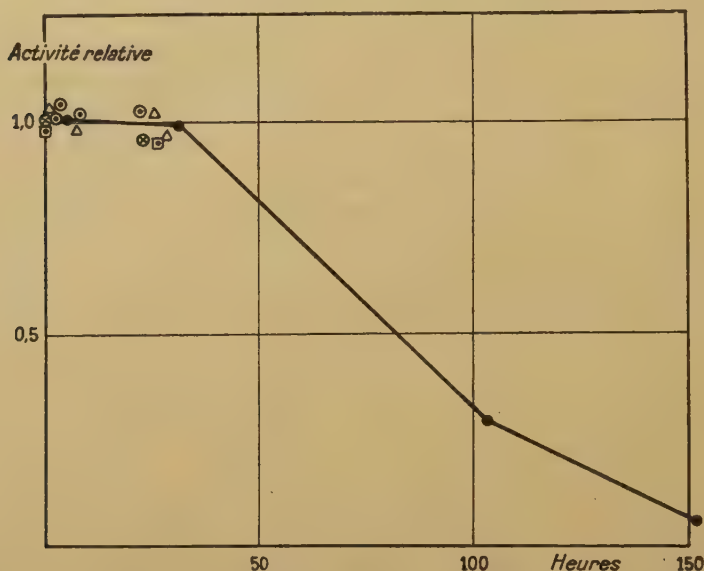


Fig. 20. — Variations de l'activité des différentes BM-réductases au cours de la conservation des broyats à la glacière. Points : lactico-BM-réductase ; cercles, croix, carrés et triangles : les réductases malique, succinique, de l'α-glycérophosphate et de l'alcool, respectivement. Conditions standard des tests v. tableaux XX, XXIII, XXV, XXVIII et XXIX.

Les deux souches réduisent le cytochrome *c* ajouté avec des vitesses sensiblement identiques (tableau XXII). La figure 21 donne les résultats d'une expérience de ce type. L'activité est tout à fait négligeable, que ce soit en absence d'enzyme ou en absence de substrat. La vitesse de réduction est légèrement affectée par la concentration du cytochrome *c* : dans l'expérience représentée par la figure 21, les valeurs du $Q_{cyt. c}^{lactate}$ de la souche normale sont, après correction pour 28° : 852, 884 et 1024 pour les concentrations de cytochrome *c* de 1,1 ; 2,2 et $4,4 \times 10^{-5}$ M. Pour la souche « petite », les valeurs du $Q_{cyt. c}^{lactate}$ sont 901, 1054 et 1075. La détermination exacte de la cinétique de la réaction est rendue difficile par la précision relati-

TABLEAU XX

Comparaison des activités de la lactico-BM réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Broyat	$Q_{BM}^{lact.}$	$Q_{BM}^{lact.} (N)$	$R_{BM}^{lact.} (N)$	Broyat	$Q_{BM}^{lact.}$	$Q_{BM}^{lact.} (N)$	$R_{BM}^{lact.} (N)$
D 1	337	177	73,3	D 5	259	144	78,4
D 2	280	137	60,9	D 10	318	154	77,5
D 3	328	170	75,2	D 12	330	228	109
D 9	252	150	71,1				
D 11	170	117	63,0				
Moyenne			68,7	Moyenne			88,3

dl-lactate 0,06 M ; KCN 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; pH 5,3 ; 0,3 cm³ de broyat dialysé.

TABLEAU XXI

Comparaison des activités de la lactico-BM réductase dans les jus de Lebedeff des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Jus	$Q_{BM}^{lact.}$	$Q_{BM}^{lact.} (N)$	$R_{BM}^{lact.} (N)$	Jus	$Q_{BM}^{lact.}$	$Q_{BM}^{lact.} (N)$	$R_{BM}^{lact.} (N)$
L ₁	45	55	2,7	L ₇	39	82	3,4
L ₂	55	112	2,9	L ₈	44	—	4,0

Volume total 4,0 cm³ ; dl-lactate 0,06 M ; BM $6,3 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,1 M ; pH 5,2 ; 1,0 cm³ de jus dialysé.

TABLEAU XXII

Comparaison des activités de la lactico-cytochrome c réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Broyat	$Q_{cyt. c}^{lact.}$	$Q_{cyt. c}^{lact.} (N)$	$R_{cyt. c}^{lact.} (N)$	Broyat	$Q_{cyt. c}^{lact.}$	$Q_{cyt. c}^{lact.} (N)$	$R_{cyt. c}^{lact.} (N)$
D 9	884	525	249	D 10	1054	210	257
D 11	630	432	233	D 12	824	568	274
D 29	532	214	159	D 28	576	226	140
Moyenne			214	Moyenne			224

Les vitesses sont corrigées pour 28° en admettant un $Q_{10} = 2$; dl-lactate 0,017 M ; KCN 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; cytochrome c $2,2 \times 10^{-5}$ M ; 0,06 cm³ de broyat dialysé ; pH 7,1.

vement faible des mesures, due surtout aux variations de température. On notera cependant que de toutes les réactions de réduction du cytochrome *c* étudiées, la réduction par le lactate ressemble le plus, au point de vue cinétique, à une réaction du premier ordre.

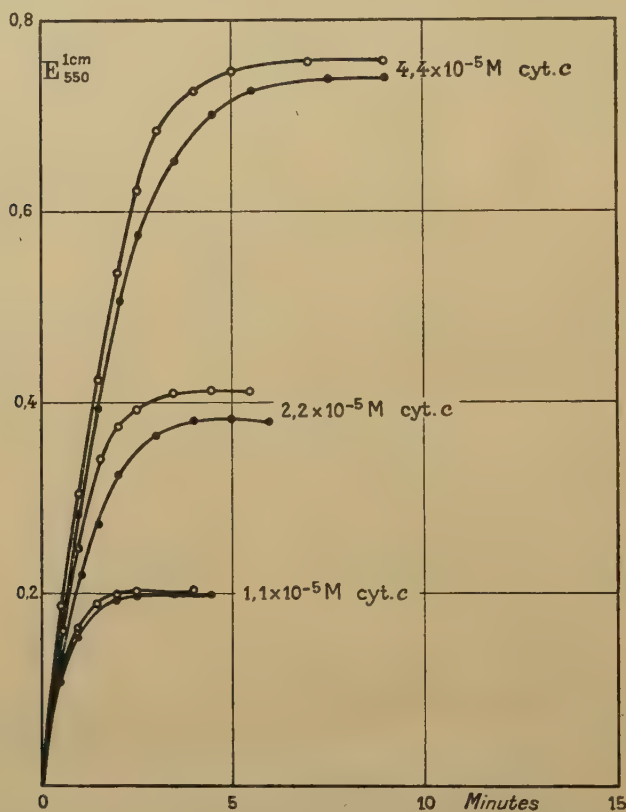


Fig. 21. — Réduction du cytochrome *c* par les broyats dialysés des souches 59 R et 59 RA en présence de lactate.

dl-lactate 0,017 M ; KCN 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; 0,06 cm³ broyat ; pH 7,1 ; t° 25,8-27,7. Points : broyat de 59 R ; cercles : broyat de 59 RA.

3.352. SUCCINO-BM-RÉDUCTASE ET SUCCINO-CYTOCHROME *c*-RÉDUCTASE

L'oxydation de l'acide succinique et le système enzymatique qui la catalyse sont certainement les sujets les plus étudiés dans le domaine de la respiration cellulaire. A l'heure actuelle, le nombre de publications s'élève à plus de cent et il n'est pas question de passer ici en revue même les plus importantes, d'autant que de nombreuses

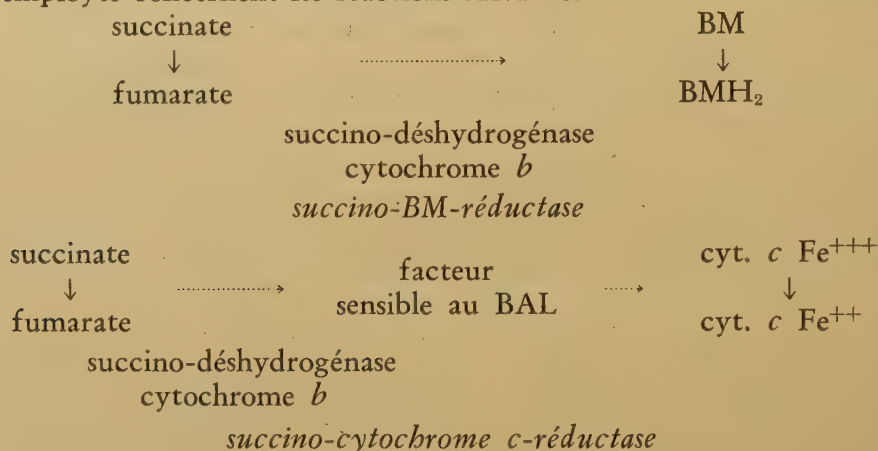
mises au point ont été publiées (cf. SZENT-GYÖRGYI, 1937 ; SCHLENK, 1951). Nous voudrions seulement dégager les quelques points de l'étude du muscle et des bactéries qui nous paraissent particulièrement intéressants et discuter plus amplement le problème de la succino-déshydrogénase de la levure, car il est, depuis une dizaine d'années, l'objet de controverses continues.

Continuant les travaux de KEILIN et HARTREE (1940), SLATER (1949 *c, d*) a montré que, dans le muscle cardiaque, le système oxydant l'acide succinique (succino-oxydase) comporte plusieurs constituants: la succino-déshydrogénase, le cytochrome *b*, un facteur inconnu sensible au BAL (British Anti-lewisit : 2,3-dimercaptopropanol), le cytochrome *c*, les cytochromes *a* et *a₃*, la cytochrome-oxydase. Etant donné qu'aucun des facteurs intervenant avant le cytochrome *c* n'a été obtenu à l'état pur, nos connaissances sur leur nature sont forcément dues à des méthodes indirectes. BACH et coll. (1946), BALL et coll. (1947) ont suggéré que le cytochrome *b* est identique à la déshydrogénase succinique *sensu stricto* ; leur argument est fondé sur l'impossibilité de séparer ces deux constituants. Ce point de vue est fortement appuyé par les recherches de PAPPENHEIMER et HENDEE (1947, 1949) qui ont montré que, dans les extraits de *Corynebacterium diphtheriae*, le cytochrome *b* est le facteur limitant la vitesse de l'oxydation du succinate par l'oxygène moléculaire. Les résultats de SLATER (1949 *c, d*), sur la réduction du BM par le succinate en présence de préparations de muscle et de rein, indiquent aussi que le cytochrome *b* fait partie du système. Enfin, les récents travaux de TSOU (1951 *a*) et de CLARK et coll. (1951) suggèrent que l'enzyme activant le succinate dans le muscle cardiaque n'est pas identique avec le cytochrome *b*, mais que ce dernier sert d'accepteur d'électrons pour la déshydrogénase. JOHNS (1951) a trouvé une activité notable de la succino-BM-réductase chez certaines bactéries qui ne montrent pas de spectre des cytochromes même à -170° .

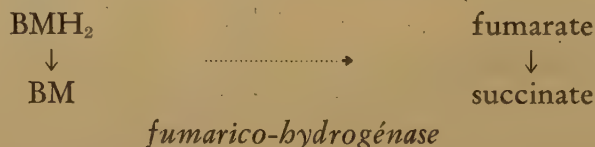
L'activité du système succinate $\rightarrow$ O₂ ou succinate $\rightarrow$ BM n'a jamais été démontrée très clairement chez les levures. Ni HAHN et HAARMANN (1928), ni KREBS (1943, 1949) n'ont réussi à la mettre en évidence, et KREBS (*l. c.*) affirme que ce système n'existe pas dans ces microorganismes. D'après cet auteur, les résultats positifs de LYNEN et NECIULLAH (1939), et de LYNEN (1943), ne peuvent pas être considérés comme valables, car le matériel sur lequel ces auteurs ont travaillé se révéla lourdement infecté par l'*Oidium albicans*, moisissure qui métabolise activement le succinate. A notre connaissance, le seul travail, où une très faible activité de

la succino-BM-réductase a été trouvée, est celui de CHANTRENNE (1943). La microméthode employée par cet auteur ne permet cependant pas de se faire une idée de la valeur physiologique de la réaction.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 3.33, le broyat de 59 R respire quantitativement le succinate ajouté, ce qui implique la présence d'une succino-oxydase. Les tests que nous avons employés concernent les réactions suivantes :



La figure 22 montre les variations de l'activité de la succino-BM-réductase en fonction du pH et la figure 20 la relation entre l'activité et le temps de conservation à froid. Le tableau XXIII permet la comparaison des deux souches, normale et mutante. On constate que la dernière est totalement dépourvue d'activité, car les $Q_{BM}^{succinate}$ sont les mêmes que les Q_{BM} en absence de substrat (en moyenne 1). Le problème se pose donc de savoir si ce manque d'activité est dû à l'absence de l'un des constituants du système, ou à la présence d'un inhibiteur. Cette dernière possibilité est suggérée par les travaux de FISCHER et coll. (1937, 1939), qui ont trouvé chez la levure un enzyme flavoprotéinique, la fumarico-hydrogénase, qui catalyse la réaction inverse.



L'augmentation de l'activité de la fumarico-hydrogénase chez la « petite » pourrait donc simuler l'absence de succino-déshydrogénase si le seul test utilisé était la réduction du BM. Puisque le cyto-

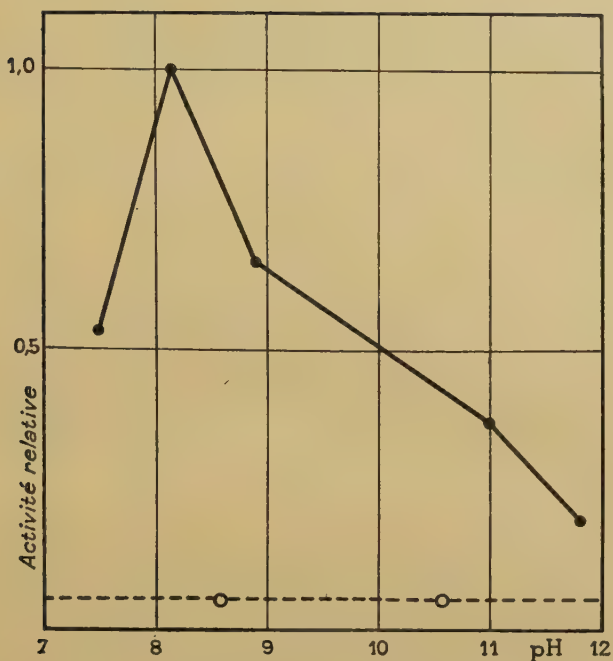


Fig. 22. — Activité de la succino-BM-réductase en fonction du pH.

Points : broyat de 59 R à $Q_{BM}^{succ.} = 37,9$ à l'optimum de pH ; succinate 0,06 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M. Cercles : idem sans succinate.

TABLEAU XXIII

Comparaison des activités de la succino-BM réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Broyat	$Q_{BM}^{succ.}$	$Q_{BM}^{succ.} (N)$	$R_{BM}^{succ.} (N)$	Broyat	$Q_{BM}^{succ.}$	$Q_{BM}^{succ.} (N)$	$R_{BM}^{succ.} (N)$
D 1	58,0	30,5	12,6	D 5	< 1	< 0,5	< 0,25
D 3	37,9	19,7	8,7	D 10	1,8	0,9	0,45
D 9	38,0	22,7	10,7	D 12	< 1,4	< 1,0	< 0,45
D 11	23,0	15,8	8,5				
Moyenne			10,1	Moyenne			< 0,3

Succinate 0,06 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; pH 8,2 ; 0,3 cm³ broyat dialysé.

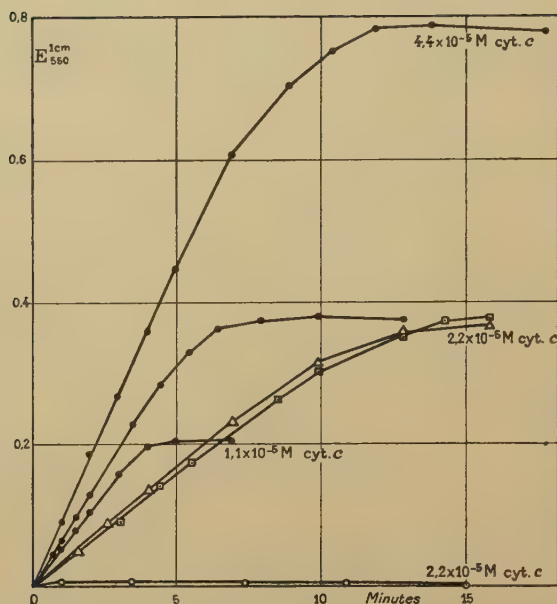


Fig. 23. — Réduction du cytochrome *c* par les broyats dialysés des souches 59 R et 59 RA en présence de succinate.

Succinate 0,017 M; KCN 0,003 M; tampon phosphate 0,05 M; pH 7,1; t° 24,5 à 27°. Points : 0,06 cm³ broyat de 59 R; cercles : 0,06 cm³ broyat de 59 RA; triangles : 0,03 cm³ broyat de 59 R; carrés : 0,03 cm³ broyat de 59 R et 0,03 cm³ de broyat de 59 RA.

chrome *c* réduit ne peut pas servir de donateur d'hydrogène pour l'enzyme flavinique (FISCHER, *l. c.*), l'activité de la succino-cytochrome *c*-réductase n'est pas influencée par la présence de la fumarico-hydrogénase. Comme le montrent le tableau XXIV et la figure 23, la réaction succinate $\longrightarrow$ cytochrome *c* n'a certainement pas lieu chez 59 RA, et les enzymes de 59 R ne sont pas inhibés par le broyat du mutant. On voit en outre que le cytochrome *c* est quantitativement réduit par le système enzymatique de la souche normale.

3.353. α -GLYCÉROPHOSPHATE-BM-RÉDUCTASE ET α -GLYCÉROPHOSPHATE CYTOCHROME *c*-RÉDUCTASE

L'utilisation par la levure de l'acide α -glycérophosphorique a été observée, pour la première fois, par MEYERHOF (1919). Depuis,

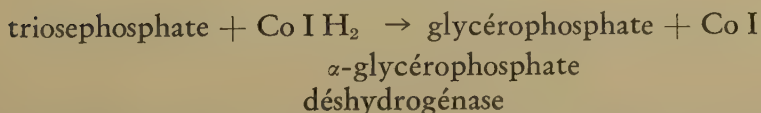
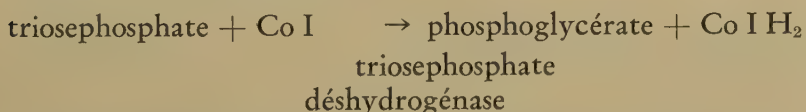
TABLEAU XXIV

Comparaison des activités de la succino-cytochrome c réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Broyat	Q _{succ. cyt. c}	Q _{succ. cyt. c (N)}	R _{succ. cyt. c (N)}	Broyat	Q _{succ. cyt. c}	Q _{succ. cyt. c (N)}	R _{succ. cyt. c (N)}
D 9	261	155	73,5	D 10	0	0	0
D 11	173	118	63,9	D 12	0	0	0
D 29	226	91	67,6	D 28	2	0,8	0,6
Moyenne			68,3	Moyenne			0,2

Les vitesses sont corrigées pour 28° en admettant un $Q_{10} = 2$; succinate 0,017 M ; KCN 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; cytochrome c $2,2 \times 10^{-5}$ M ; 0,06 cm³ de broyat dialysé ; pH 7,1.

presque tous les travaux sur ce sujet ont porté sur des tissus animaux, de sorte que nous ne savons que peu de choses sur le mécanisme grâce auquel la levure respire cet acide. Les tissus animaux possèdent deux déshydrogénases distinctes qui activent l' α -glycérophosphate : la première, qui réduit le cytochrome c directement, sans addition de coenzymes, a été étudiée par GREEN (1936). Elle est spécifique de l' α -glycérophosphate, et le produit de la réaction est le phosphoglyceraldéhyde. A plusieurs égards elle ressemble à la déshydrogénase succinique (liaison avec les particules insolubles, stabilité), mais n'est pas identique à celle-ci (AHLGREN, 1925 ; ALWALL, 1929). Elle ne semble pas participer à la glycolyse, et OGSTON et GREEN (1935), et GREEN (1936), n'ont pas réussi à la mettre en évidence chez la levure. La deuxième déshydrogénase qui réduit le Co I au lieu du cytochrome c, participe vraisemblablement à la glycolyse, surtout au début de celle-ci, quand le pyruvate servant d'accepteur d'H₂ manque (EULER et coll., 1937). Il se produit alors une dismutation :



Son existence chez la levure n'est pas démontrée. OGSTON et GREEN (1935) ont préparé une α -glycérophosphate-déshydrogénase soluble,

à partir de la levure, mais leur préparation avait apparemment les caractères d'une déshydrogénase aérobie, car son activité, mesurée par l'absorption d'O₂, n'était pas augmentée par l'addition de bleu de méthylène, de cytochrome *c*, de Co I et de flavoprotéine.

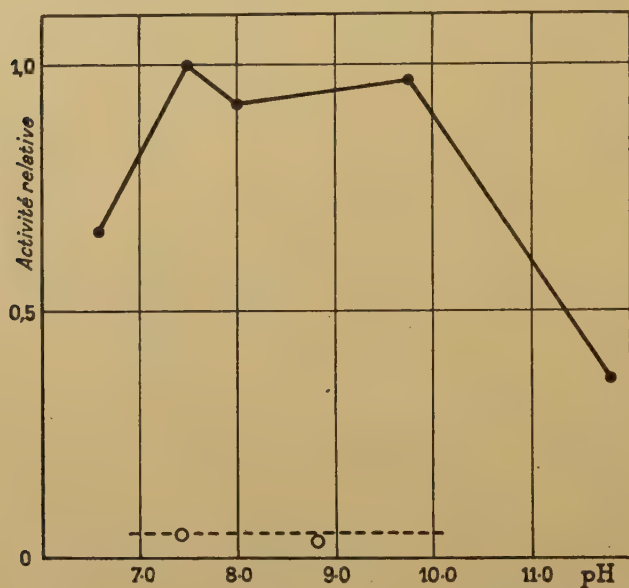


Fig. 24. — Activité de l' α -glycérophosphate-BM-réductase en fonction du pH.

Points : broyat de 59 R à $Q_{BM}^{gl. ph.} = 72$ à l'optimum de pH ; L- α -glycérophosphate 0,06 M ; KCN 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M. Cercles : idem sans substrat.

Nous nous sommes préoccupé uniquement de la déshydrogénase liée au cytochrome *c*, indépendante du Co I. Des expériences préliminaires ont montré que, contrairement aux résultats de GREEN (1936), la levure possède un enzyme fort actif qui réduit le cytochrome *c* ajouté en présence d' α -L-glycérophosphate, et que le Co I n'est pas nécessaire à son fonctionnement. La figure 24 présente la relation entre l'activité de l' α -glycérophosphate-BM-réductase du broyat des « grandes » et le pH. On constate l'existence d'un très large optimum entre pH 7 et 9 qui est identique à celui de l'enzyme extrait du muscle (GREEN, *l. c.*). Les tests ont été effectués en présence de KCN afin de fixer l'aldéhyde formé au cours de la réaction, qui pourrait influencer la vitesse de réduction du BM. D'autres

expériences ont montré que le temps de réduction du BM était proportionnel à la dilution de l'enzyme et que l'activité du broyat n'était pas modifiée au cours des premières 24 heures de conservation à 0-4° (fig. 20). Les essais effectués sur le jus de Lebedeff ont donné des résultats totalement négatifs quant à la présence de cet enzyme.

TABLEAU XXV

Comparaison des activités de l' α -glycérophosphate-BM réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Broyat	$Q_{BM}^{gl. ph.}$	$Q_{BM}^{gl. ph. (N)}$	$R_{BM}^{gl. ph. (N)}$	Broyat	$Q_{BM}^{gl. ph.}$	$Q_{BM}^{gl. ph. (N)}$	$R_{BM}^{gl. ph. (N)}$
D 3	71,5	37,2	16,4	D 5	5,4	3,0	1,6
D 9	36,1	21,5	10,2	D 10	7,4	3,6	1,8
D 11	38,0	26,0	14,0	D 12	8,6	5,9	2,8
Moyenne			13,5	Moyenne			2,1

L- α -glycérophosphate 0,06 M ; KCN 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; pH 8,2 ; 0,3 cm³ broyat dialysé.

Le tableau XXV permet la comparaison de la réduction du BM par les broyats des souches « grandes » et « petites ». On constate que les broyats des « grandes » sont 8 à 10 fois plus actifs que les broyats des mutants. Pour ces derniers, il faudrait savoir : 1) si l'activité mesurée est différente de façon significative de l'activité en absence de substrat, 2) si la diminution de l'activité est due à une différence de la quantité d'enzyme, ou à la présence d'un inhibiteur, et 3) si les réactions étudiées sont qualitativement identiques.

La réponse à la première question est positive. En effet, les Q_{BM} trouvés pour les broyats des « petites », en absence de substrat et dans des conditions identiques, ont été < 1 ; 1,5 et $< 1,4$ (préparations D₅, D₁₀ et D₁₂), tandis qu'en présence d' α -glycérophosphate, l'activité était plus grande ($Q_{BM}^{\alpha-gl. ph.}$ entre 5 et 8). Il en est de même pour la réduction du cytochrome *c*. Comme le montre la figure 25, bien que la différence soit encore une fois très petite, le broyat de 59 RA réduit le cytochrome *c* plus vite en présence d' α -glycérophosphate qu'en son absence. Pour vérifier la deuxième possibilité, nous avons comparé la réduction du cytochrome *c* par les broyats de 59 R et 59 RA ainsi que par leur mélange. Comme on

le voit dans la figure 25, l'activité du mélange n'est pas différente de la somme des activités mesurées séparément ; on peut donc écarter l'hypothèse d'un inhibiteur. La réponse à la troisième question ne peut pas être donnée pour l'instant. Il est, en effet, tout à fait concevable que, chez la « petite », l' α -glycérophosphate-déshydrogénase soit absente, et que la faible activité que l'on mesure soit due à la déshydrogénation d'une autre substance, provenant elle-même de l' α -glycérophosphate par un mécanisme qui ne comporte pas l'oxydation de ce dernier. La purification de l'enzyme, ainsi que les dosages de phosphoglyceraldéhyde formé au cours de la réaction, peuvent donner une réponse décisive à cette question.

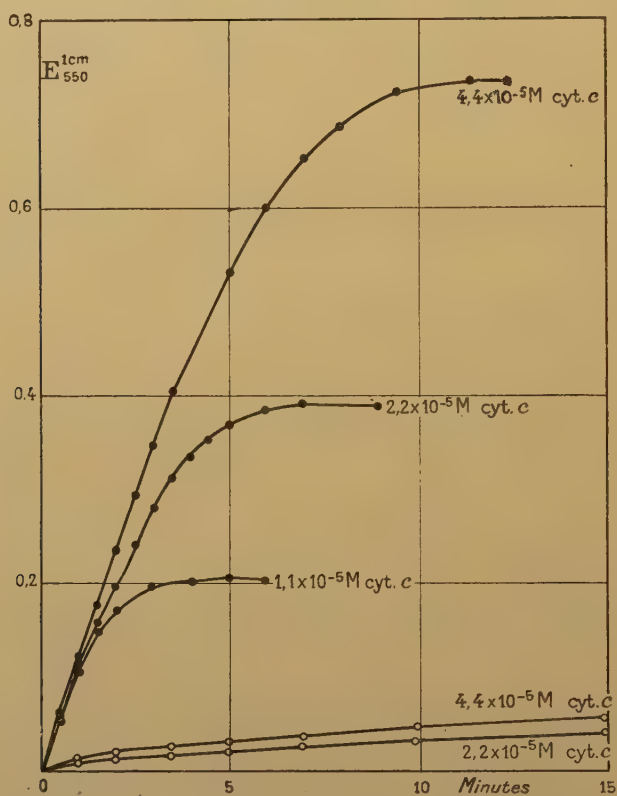


Fig. 25. — Réduction du cytochrome c par les broyats dialysés des souches 59 R et 59 RA en présence d' α -glycérophosphate.

L- α -glycérophosphate 0,017 M ; KCN 0,003 M ;
tampon phosphate 0,05 M ; 0,06 cm³ broyat ;
pH 7,1 ; t° 27,7-28,4.

Points : broyat de 59 R ; cercles : broyat de 59 RA.

L'étude de la réduction du cytochrome *c* confirme les résultats obtenus avec le BM comme accepteur. La cinétique de la réduction du cytochrome *c* n'est certainement pas du premier ordre (figure 25). Le tableau XXVI montre que les valeurs de $Q_{\text{cyt. } c}^{\alpha\text{-gl. ph.}}$ et $R_{\text{cyt. } c}^{\alpha\text{-gl. ph.}}$ (N) des « grandes » sont au moins 50 fois plus élevées que celles des « petites ».

TABLEAU XXVI

*Comparaison des activités de l' α -glycérophosphate-cytochrome *c* réductase dans les broyat des souches 59 R et 59 RA.*

59 R				59 RA			
Broyat	$Q_{\text{cyt. } c}^{\text{gl. ph.}}$	$Q_{\text{cyt. } c}^{\text{gl. ph.}}(\text{N})$	$R_{\text{cyt. } c}^{\text{gl. ph.}}(\text{N})$	Broyat	$Q_{\text{cyt. } c}^{\text{gl. ph.}}$	$Q_{\text{cyt. } c}^{\text{gl. ph.}}(\text{N})$	$R_{\text{cyt. } c}^{\text{gl. ph.}}(\text{N})$
D 9	358	212	101	D 10	13	6,6	3,3
D 11	208	142	76,9	D 12	3	2,1	1,0
D 29	206	83	61,6	D 28	0	0	0
Moyenne			79,8	Moyenne			1,4

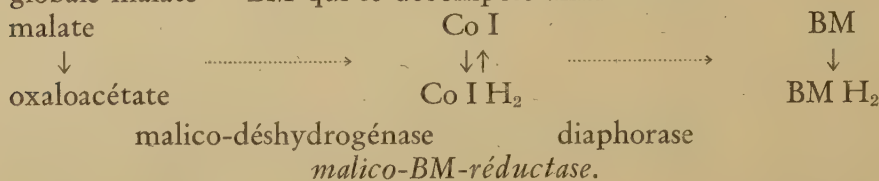
Les vitesses sont corrigées pour 28° en admettant un $Q_{10} = 2$; L- α -glycérophosphate 0,017 M ; KCN 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; cytochrome *c* $2,2 \times 10^{-5}$ M ; 0,06 cm³ de broyat dialysé ; pH 7,1.

3.354. MALICO-BM-RÉDUCTASE ET MALICO-CYTOCHROME *c*-RÉDUCTASE,

Avec les expériences sur l'oxydation de l'acide malique, nous commençons l'étude des déshydrogénases dépendant du Co I. Le système complet qui catalyse cette oxydation est composé, dans les tissus animaux, de la déshydrogénase malique, du Co I, de la Co I-cytochrome *c*-réductase, du cytochrome *c*, des cytochromes *a* et *a*₃, et de la cytochrome-oxydase (POTTER, 1946). L'existence de la déshydrogénase malique chez la levure a été observée par NEUBERG et TIR (1911), et FODOR et FRANKENTHAL (1932). ANDERSSON (1933) a montré qu'elle exige pour son fonctionnement la présence d'un coenzyme. L'enzyme a été surtout étudié dans les tissus animaux (GREEN, 1936 *b* ; STRAUB, 1942 ; POTTER, 1946) où on a pu montrer que le produit de l'oxydation était l'oxaloacétate, que le coenzyme était le Co I et que la déshydrogénase malique était distincte de la déshydrogénase lactique qui dépend du Co I. Le problème des accepteurs d'H pour la déshydrogénase a été élucidé par les travaux de GREEN (1936), et de DIXON et ZERFAS (1940). Les accepteurs finaux peuvent être divisés en trois groupes : 1) ceux

qui sont directement réduits par la déshydrogénase (p. ex. l'alloxane) ; 2) ceux qui exigent le Co I [$K_3Fe(CN)_6$] ; et 3) ceux pour lesquels la présence simultanée du Co I et de la flavoprotéine est indispensable (BM, cytochrome *c*).

Le test que nous avons employé mesure l'activité de la réaction globale malate $\rightarrow$ BM qui se décompose ainsi :



Des expériences préliminaires ont montré 1) que l'addition du Co I au broyat est nécessaire à la réduction du BM ; 2) que l'activité est proportionnelle à la quantité d'enzyme (fig. 19) ; 3) qu'elle reste constante pendant les premières 30 heures de séjour à la glacière (fig. 20) ; et 4) que la vitesse de réduction du BM en absence de substrat est $< 1\%$ de la vitesse en sa présence. Nous avons constaté aussi qu'en absence de KCN, l'activité du broyat était diminuée de 90 à 95 %. La situation est donc analogue à celle discutée à propos de la lactico-BM-réductase sauf que, dans le cas présent, l'effet du cyanure est beaucoup plus marqué. Il est intéressant de rapprocher cette observation des résultats de DAS (1937) qui montrent que l'oxaloacétate inhibe la déshydrogénase malique beaucoup plus que le pyruvate n'inhibe celle de l'acide lactique (inhibitions de 50 % aux concentrations 4×10^{-5} M et 10^{-3} M respectivement). Il est donc hautement vraisemblable que la stimulation par le KCN, observée dans nos expériences, est due à la fixation de l'oxaloacétate.

Les déterminations du pH optimum ont révélé que le système BM-malate se comporte différemment des autres systèmes étudiés, à l'exception de l'alcool-BM-réductase. Comme le montre la figure 26, les différents broyats préparés à partir de la même souche fournissent des courbes assez différentes les unes des autres. Etant donné que ces variations ne peuvent être attribuées ni à l'imprécision des mesures du pH, ni à l'imprécision du test enzymatique, elles doivent refléter des variations soit dans la préparation du broyat, soit dans l'état de la souche. En outre, les optima du pH diffèrent chez 59 R et 59 RA de façon significative (8,8 à 9,0 pour la « grande » et 8,2 à 8,3 pour la « petite »). Les résultats obtenus deviennent compréhensibles lorsque'on songe que le système malate-BM comporte deux constituants qui peuvent avoir des optima de pH différents ; si leur concentration peut varier indépendamment,

la vitesse globale optima sera limitée par la partie commune des deux courbes de pH. S'il en était ainsi, la souche 59 RA devrait avoir moins du constituant à optimum de pH plus acide, car la diminution de l'activité globale est accompagnée d'un déplacement vers l'acidité. La validité de ce raisonnement est fortement appuyée par l'étude de l'alcool-BM-réductase où la situation est renversée : la souche normale montre une activité moindre, et un optimum de

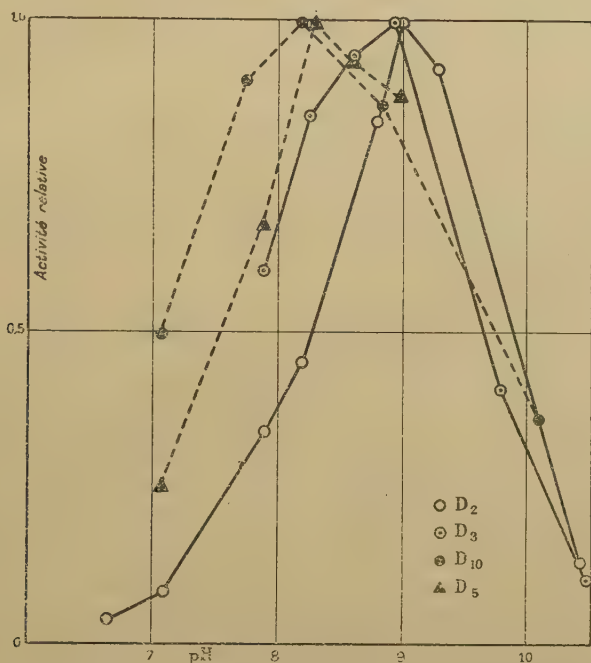


Fig. 26. — *Activité de la malico-BM-réductase en fonction du pH.*

Trait plein : broyats dialysés D₂ et D₃ de 59 R
 $Q_{BM}^{mal.} = 1362$ et 1893 respectivement. *Trait pointillé :* broyats dialysés D₅ et D₁₀ de 59 RA à
 $Q_{BM}^{mal.} = 535$ et 473 respectivement. l-malate 0,06 M ; KCN 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; 0,15 cm³ de broyat ; CoI $2,5 \times 10^{-5}$ M.

pH à 7,7, tandis que la souche mutante, qui possède apparemment plus d'enzyme, présente un optimum déplacé vers l'alcalinité (env. 8,2). FODOR et coll. (1931) ont trouvé une situation semblable dans les extraits de graines : l'optimum de pH de la malico-BM-réductase varie d'une plante à l'autre. EULER et GUNTHER (1938) et EULER

TABLEAU XXVII

Inhibition de l'activité des BM réductases, malique et de l'alcool par le tampon borate.

Tampon phosphate			Tampon borate		
Broyat	Q_{BM}^{malate}	pH final	Q_{BM}^{malate}	pH final	Inhibition %
59 R D 2	1.362	9,1	28	9,1	98
59 R D 3	1.893	8,9	27	8,9	99
59 R D 3	1.137	7,9	166	7,9	85
	Q_{BM}^{alcool}		Q_{BM}^{alcool}		
59 R D 2	318	7,8	< 10	7,9	> 97

Substrat 0,06 M ; CoI $2,5 \times 10^{-5}$ M ; KCN ou semicarbazide 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; tampon 0,06 M ; 0,15 cm³ de broyat dialysé.

et HELLSTRÖM (1938) ont trouvé l'optimum de la diaphorase à pH 10,0 et ont montré que cet enzyme est inhibé par le borate. Comme on voit dans le tableau XXVII, les activités de la BM-réductase malique et de l'alcool-BM-réductase sont complètement inhibées par le borate, ce qui s'explique par la présence de la diaphorase qui est le chaînon commun aux deux réactions ⁽¹⁾. Le borate n'inhibe pas la réduction du BM par le lactate, le succinate et l' α -glycérophosphate, réactions dans lesquelles la diaphorase n'intervient pas. Tout se passe donc comme si, dans nos broyats, la vitesse globale était limitée par la quantité de déshydrogénases proprement dites et comme si la diaphorase se trouvait en excès. En effet, les valeurs absolues du Q_{BM}^{alcool} sont beaucoup plus grandes que les valeurs du Q_{BM}^{malate} pour 59 RA et le contraire est vrai pour 59 R. Les « petites » contiendraient moins de déshydrogénase malique et plus d'alcool-déshydrogénase (tableaux XXVIII et XXIV). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer la vitesse de déshydrogénation du substrat par la vitesse de réduction du $K_3Fe(CN)_6$ ou du Co I, par exemple, réactions dans lesquelles la diaphorase n'intervient pas.

(1) Dans un travail récent, BRODIE et GOTS (1951) ont trouvé que la diaphorase de la levure présente une très forte activité à pH 8,3, tandis que, à pH 9,2, son activité est nulle. Les auteurs attribuent ces faits à l'influence du pH. Etant donné que les mesures ont été effectuées dans les tampons phosphate (pH 8,3) et borate (pH 9,2), il nous paraît probable que leur interprétation est erronée, et que la perte d'activité est due à l'inhibition par le borate.

TABLEAU XXVIII

*Comparaison des activités de la malico-BM réductase dans les broyats
des souches 59 R et 59 RA.*

59 R				59 RA			
Broyat	Q_{BM}^{malate}	$Q_{BM}^{malate} (N)$	$R_{BM}^{malate} (N)$	Broyat	Q_{BM}^{malate}	$Q_{BM}^{malate} (N)$	$R_{BM}^{malate} (N)$
D 2	1.362	668	306	D 5	535	296	162
D 3	1.893	983	434	D 10	473	229	116
D 7	980	584	276	D 12	450	310	149
D 11	917	628	339				
Moyenne			339	Moyenne			142

l-malate 0,06 M ; KCN 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; CoI $2,5 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; 0,15 cm³ broyat dialysé ; pH 8,8-9,0 pour 59 R et 8,2-8,3 pour 59 RA.

L'étude de la réduction du cytochrome *c* par le malate met en évidence un phénomène intéressant. Le broyat dialysé des « grandes » ne réduit pas le cytochrome *c* en présence de malate. Cependant cette réduction s'effectue immédiatement après la reconstitution de la chaîne complète par addition du Co I (fig. 27 A). Ceci est en accord avec les données discutées page 99, qui indiquent que la déshydrogénase malique réduit le cytochrome *c* par l'intermédiaire du Co I. On retrouve un phénomène tout à fait analogue avec l'alcool. Les systèmes incomplets (broyat + Co I ; broyat + alcool ; alcool + Co I) sont inactifs, et la reconstitution de la chaîne complète (alcool + Co I + broyat) amène une réduction rapide du cytochrome *c* (fig. 27 A). Ces expériences montrent que le broyat des « grandes » contient la Co I H₂-cytochrome *c*-réductase

Le broyat des mutants se comporte différemment. *L'addition du malate seul assure la réduction complète du cytochrome c, et la vitesse de la réaction n'est pas accrue par addition de coenzyme I* (fig. 27 B). Cette vitesse ($Q_{cyt. c}^{malate} (N) = 64 - 80$ pour 59 RA) est moindre que celle de la réaction malate + Co I $\rightarrow$ cytochrome *c* chez 59 R ($Q_{cyt. c}^{malate + CoI} (N) = 410-540$), mais beaucoup plus grande que la vitesse de réduction en absence de substrat. On doit se demander d'abord si ce phénomène ne résulte pas d'une rétention plus grande du Co I dans le broyat de « petites », qui s'y trouverait en excès même après dialyse. Il n'en est cependant rien, comme le montre une expérience avec l'alcool (fig. 27 B). En effet, le même broyat de 59 RA qui réduit le cytochrome *c* en présence de malate,

ne réduit pas le cytochrome *c* en présence d'alcool, bien qu'il contienne une puissante alcool-déshydrogénase. Les expériences relatées dans le paragraphe 3.356 montreront que les « petites » sont dépourvues de Co I H₂-cytochrome *c*-réductase.

Il est donc évident que les mutants sont capables d'effectuer une réaction qui n'a pas lieu dans les souches « grandes » dont ils dérivent. Quel est l'enzyme responsable de cette nouvelle réaction ?

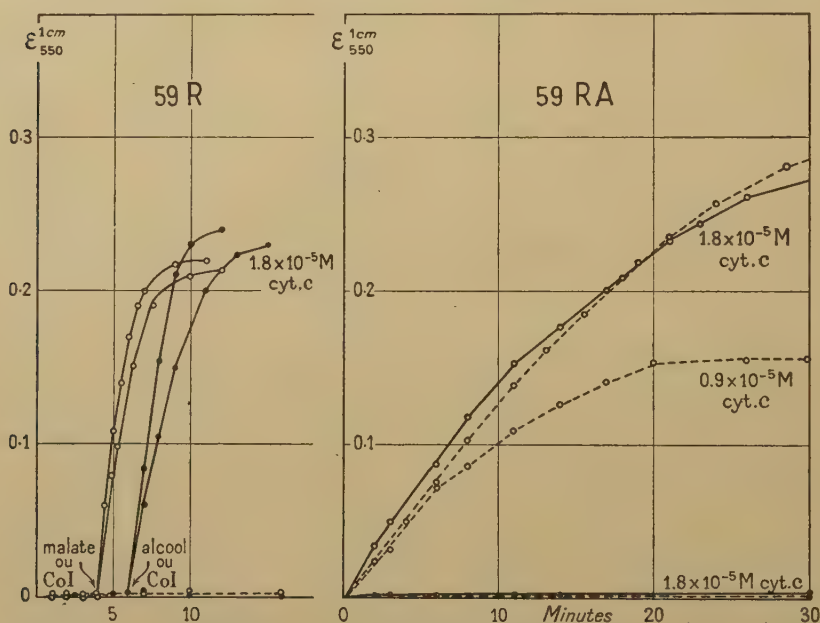


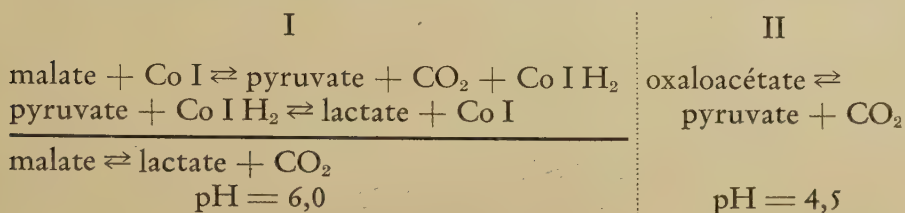
Fig. 27. — Réduction du cytochrome *c* par les broyats dialysés des souches 59 R et 59 RA en présence de malate et d'alcool.

1-malate ou alcool 0,017 M ; CoI $2,8 \times 10^{-5}$ M ; KCN 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; 0,06 cm³ de broyat ; pH 7,1 ; t° 25,2 à 28,5.

Cercles : malate ; points : alcool ; trait plein : système complet ; trait pointillé : idem sans CoI.

Deux interprétations nous paraissent possibles : a) Les « petites » possèdent un enzyme nouveau, la malico-cytochrome *c*-réductase « directe », qui ne requiert pas de coenzyme. On sait qu'il existe une étroite analogie entre la Co I-déshydrogénase malique et la Co I-déshydrogénase lactique (Das, 1937). La déshydrogénase lactique de la levure se passe de Co I (§ 3.351). Il est possible que nous ayons chez 59 RA une situation analogue en ce qui concerne le malate ; b) Le malate est transformé par le broyat des « petites » en un corps α qui est le véritable substrat de la réduction directe du cyto-

chrome *c*. OCHOA et coll. (cf OCHOA, 1951) ont récemment décrit, chez *Lactobacillus* et dans le muscle du pigeon, un système constitué par plusieurs enzymes qui catalyse la décarboxylation oxydative du malate. L' « enzyme malique » est de nature adaptative et catalyse des réactions ayant des optima de pH différents :



Il est clair que si le broyat des « petites » peut transformer le malate en lactate, par exemple, la réduction du cytochrome *c* pourrait être due à l'action de la lactico-cytochrome *c*-réductase qui, comme on l'a vu dans le paragraphe 3.351, est présente chez le mutant. Bien qu'il soit impossible pour l'instant de choisir entre ces deux hypothèses, il est évident que les « petites » effectuent une réaction nouvelle, absente chez la levure normale dont elles dérivent.

3.355. ALCOOL-BM-RÉDUCTASE

L'étude de l'alcool-déshydrogénase a joué un rôle considérable dans le développement des idées actuelles sur la respiration et la fermentation cellulaire : ce fut le premier enzyme d'oxydation reconnu comme « déshydrogénase » grâce à l'observation de WIELAND (1913), que le BM était réduit en même temps que l'alcool était oxydé par les bactéries acétiques. En outre, c'est la première déshydrogénase obtenue à l'état cristallisé (NEGELEIN et WULFF, 1937). Elle a été surtout étudiée dans des préparations de levure ; elle n'est pas strictement spécifique de l'éthanol, mais son activité décroît avec l'allongement de la chaîne des carbones (MULLER, 1934) ; elle requiert le Co I ; le produit de la réaction est l'aldéhyde acétique. NEGELEIN et WULFF (*l. c.*) ont trouvé que cet enzyme avait une affinité beaucoup plus grande pour le Co I H₂ et pour l'aldéhyde que pour l'alcool et pour le Co I. Son rôle dans la fermentation est d'oxyder le Co I réduit par la triosephosphate-déshydrogénase, et de réduire simultanément l'aldéhyde acétique provenant de la décarboxylation du pyruvate (EULER et coll., 1936). D'après DIXON et ZERFAS (1940), les accepteurs d'H de l'alcool-déshydrogénase peuvent être classés de façon identique à ceux de la déshydrogénase malique (cf. p. 99).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 3.22, les cellules intactes de 59 R respirent l'alcool avec un $Q_{O_2} \cong 90$, mais la respi-

ration du broyat n'est pas stimulée par addition d'alcool. Les expériences préliminaires ont montré 1) que l'addition du Co I au broyat est nécessaire pour la réduction du BM ; 2) que l'activité est proportionnelle à la dilution (fig. 19) et n'est pas influencée par le séjour du broyat pendant 30 heures à 0-4° (fig. 20) ; et 3) que l'activité en absence du substrat est $< 1\%$ de l'activité en sa pré-

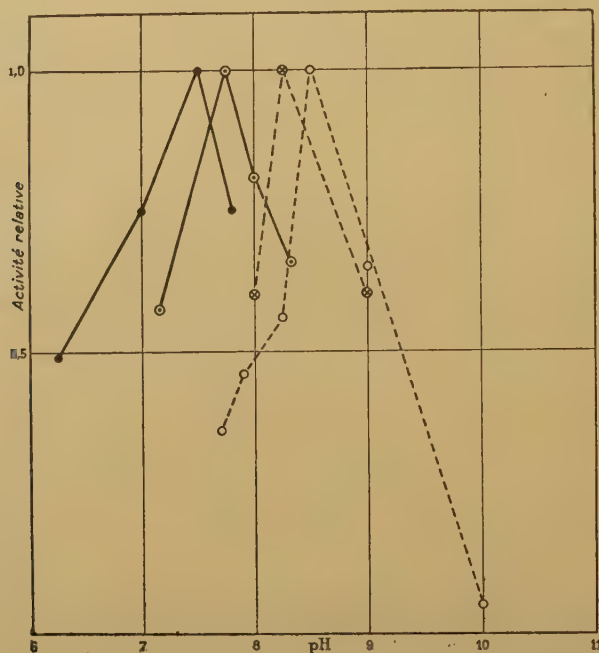


Fig. 28. — *Activité de l'alcool-BM-réductase en fonction du pH.*

Trait plein : broyats dialysés de 59 R. Trait pointillé : broyats dialysés de 59 RA. Alcool 0,06 M ; semicarbazide 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; CoI $2,5 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; 0,15 cm³ broyat.

sence. Les résultats des déterminations de l'optimum de pH (fig. 28) montrent une situation tout à fait analogue à celle de la malico-BM-réductase : les deux souches possèdent des optima légèrement différents, et la moindre activité de la souche normale est accompagnée d'un déplacement de l'optimum vers l'acidité. Toutes les valeurs trouvées sont pourtant très voisines de l'optimum de pH de l'alcool-déshydrogénase cristallisée (pH 7,8 - 7,9, d'après NEGELEIN et WULFF, 1937), ce qui appuie l'interprétation selon laquelle la déshydrogénase est le facteur limitant la vitesse de la réaction globale. L'addition de semicarbazide, qui fixe l'aldéhyde formé, aug-

mente, comme il était à prévoir, la vitesse de réduction du BM. Cet accroissement est beaucoup plus faible que la stimulation de la BM-réductase malique due à la fixation de l'oxaloacétate par le KCN. Les résultats des mesures de l'activité de l'alcool-BM-réductase des deux souches sont donnés dans le tableau XXIX. La réaction peut être représentée par le schéma

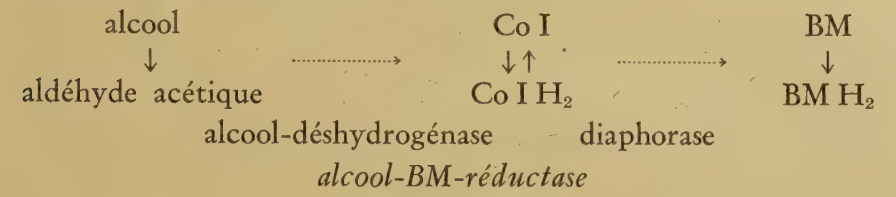


TABLEAU XXIX

Comparaison des activités de l'alcool-BM réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.

59 R				59 RA			
Broyat	Q ^{alcool} _{BM}	Q ^{alcool} _{BM} (N)	R ^{alcool} _{BM} (N)	Broyat	Q ^{alcool} _{BM}	Q ^{alcool} _{BM} (N)	R ^{alcool} _{BM} (N)
D 2	424	208	95,5	D 5	929	515	282
D 3	606	314	139	D 10	1.237	598	302
D 9	327	195	92,4	D 12	734	506	244
D 11	210	144	77,8				
Moyenne			101	Moyenne			276

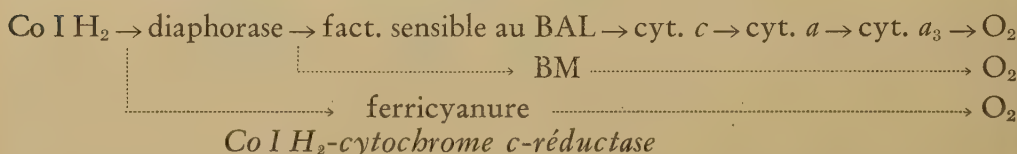
Alcool 0,06 M ; semicarbazide 0,03 M ; BM $7,2 \times 10^{-5}$ M ; CoI $2,5 \times 10^{-5}$ M ; tampon phosphate 0,06 M ; 0,15 cm³ broyat dialysé ; pH 7,7 pour 59 R et 8,2 pour 59 RA.

Le tableau XXIX montre que les « petites » possèdent deux à trois fois plus d'alcool-déshydrogénase que les « grandes ». Ce fait nous paraît particulièrement intéressant et nous en discuterons plus loin la signification (p. ...).

3.356. CoI H₂-CYTOCHROME^c-RÉDUCTASE

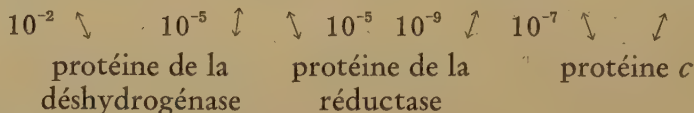
Les coenzymes réduits par les déshydrogénases spécifiques peuvent être oxydés soit anaérobiquement, soit aérobiquement. Dans le premier cas, l'accepteur d'hydrogène est un métabolite intermédiaire. Parmi les nombreuses réactions connues, deux sont décrites pages 26 et 95. Une autre réaction a été mise en évidence par DEWAN et GREEN (1937) et SLATER (1950) ; le fumarate est réduit en succinate par le Co I H₂, par l'intermédiaire de la diaphorase, du facteur sensible au BAL et du cytochrome *b*. La vitesse de cette réaction est

très faible et il est probable qu'elle ne joue pas de rôle physiologique important. En aérobiose, les Co I H_2 sont oxydés par le système cytochrome *c*-cytochrome-oxydase. La liaison entre les phosphopyridinenucléotides et le cytochrome *c* est assurée par les flavoprotéines. ADLER et coll. (1938) et DEWAN et GREEN (1938) ont montré qu'une fraction insoluble (« diaphorase » ou « coenzyme factor ») était nécessaire pour l'oxydation du Co I H_2 par le BM. STRAUB (1939) et CORRAN et coll. (1939) ont isolé du muscle cardiaque une flavoprotéine soluble qui a les propriétés catalytiques de la diaphorase et dont le groupement prosthétique est l'alloxazine-adénine-dinucléotide. Les travaux de LOCKHART et POTTER (1941), de POTTER et ALBAUM (1943) ont contribué à la compréhension de l'oxydation aérobie du Co I H_2 en montrant que le cytochrome *c* est réduit dans le broyat des tissus animaux et qu'il stimule la consommation d'oxygène. SLATER (1950) a étudié en détail le système oxydant le Co I H_2 et a proposé le schéma suivant :



L'activité de ce système dans les préparations du muscle cardiaque est, à 18°, la même que celle de la succinoxydase, et, à 37°, plus grande ; l'activité de la réductase est liée à une fraction facilement sédimentable par centrifugation (¹).

L'oxydation du triphosphopyridine-nucléotide a été étudiée par HAAS et coll. (1940-1942). Ces auteurs ont réussi à extraire de la levure une flavoprotéine soluble contenant du phosphate de riboflavine. L'enzyme a été purifié considérablement (98 %) et les constantes de dissociation des différents constituants du système : Glucose-6-phosphate $\rightleftharpoons$ TPN $\rightleftharpoons$ Allox. mononucl. $\rightleftharpoons$ Hème c



(1) Une CoI H₂-cyt. c-réductase soluble a été préparée par ALTSCHUL et coll. (1941) à partir de la levure. En se fondant sur les données publiées par ces auteurs, nous avons calculé l'activité de leurs préparations qui se sont révélées relativement faibles. En effet, leur enzyme purifié montre une activité spécifique (env. 20 mm³ H₂/h/mg ps) inférieure à celle de nos broyats non purifiés (env. 100 mm³ H₂/h/mg ps). CoI H₂-cyt. c-réductase a été récemment isolée et purifiée à partir du muscle cardiaque (MAHLER et coll., 1952 ; EDELHOCH et coll., 1952) et de *E. coli* (BRODIE, 1952). Son groupement prosthétique est le dinucléotide flavinique.

ont pu être calculées. C'est le seul cas où le transfert d'hydrogène et d'électrons entre le coenzyme réduit et le cytochrome *c* semble être assuré par un enzyme unique ⁽¹⁾.

Comme le montre la figure 29, le broyat dialysé des « grandes », en présence de CoI H_2 , réduit très rapidement le cytochrome *c*

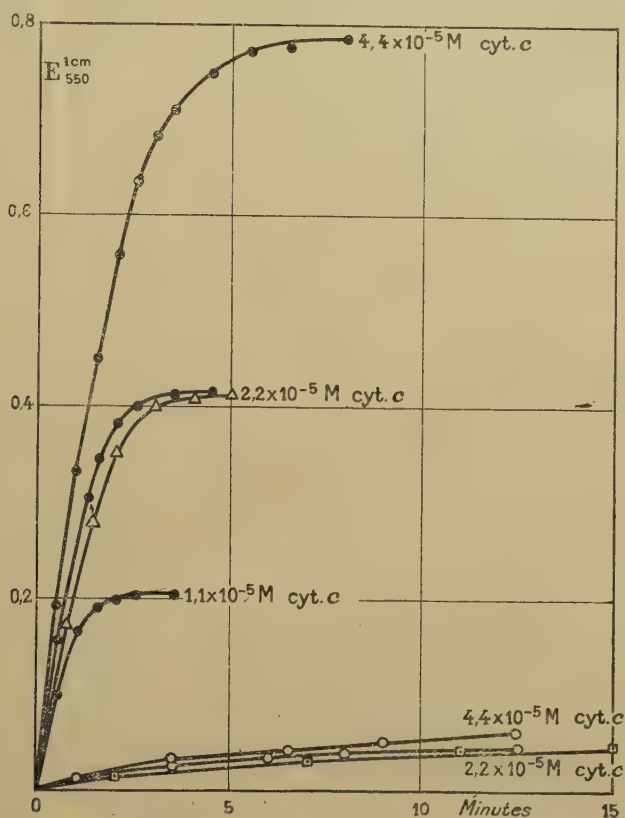


Fig. 29. — Réduction du cytochrome *c* par les broyats dialysés des souches 59 R et 59 RA en présence de CoI H_2 .

CoI H_2 $1,5 \times 10^{-5}$ M ; KCN 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; pH 7,1 ; t° 27,1 à 27,8.

Points : 0,03 cm^3 de broyat de 59 R ; cercles : 0,03 cm^3 de broyat de 59 RA ; triangles : 0,03 cm^3 de broyat de 59 RA et 0,03 cm^3 de broyat de 59 R ; carrés : réduction en absence de broyat.

⁽¹⁾ Bien que la CoII H_2 -cyt. *c*-réductase ait été considérablement purifiée, un doute subsiste quant à la conclusion qu'elle assure seule le transfert entre le CoII et le cyt. *c*. Le test enzymatique employé par HAAS et coll. (*l. c.*) comportait en effet l'emploi de préparations brutes du « Zwischenferment », de sorte que la possibilité d'un chaînon supplémentaire n'a pas pu être écartée.

ajouté. La réduction est quantitative en présence de la forme réduite du coenzyme ; l'addition du coenzyme oxydé est sans effet. En mesurant simultanément la diminution de l'absorption à 340 m μ (Co I H₂ $\rightarrow$ Co I) et l'accroissement de l'absorption à 550 m μ (cyt. *c* Fe⁺⁺⁺ $\rightarrow$ cyt. *c* Fe⁺⁺), on constate que les deux processus ont lieu simultanément. La levure normale possède donc un système analogue à celui du muscle cardiaque (SLATER, 1950). Remarquons enfin que l'activité de la Co I H₂-cytochrome *c*-réductase est beaucoup plus grande que celle des autres systèmes réduisant le cytochrome *c*. Il est donc vraisemblable qu'elle constitue la voie principale du transfert d'hydrogène dans la cellule de levure.

TABLEAU XXX

*Comparaison des activités de la Co I H₂-cytochrome *c* réductase dans les broyats des souches 59 R et 59 RA.*

59 R				59 RA			
Broyat	Q _{cyt. c} ^{Co I H₂}	Q _{cyt. c} ^{Co I H₂} (N)	R _{cyt. c} ^{Co I H₂} (N)	Broyat	Q _{cyt. c} ^{Co I H₂}	Q _{cyt. c} ^{Co I H₂} (N)	R _{cyt. c} ^{Co I H₂} (N)
D 9	2.061	1.230	581	D 10	0	0	0
D 11	1.550	1.060	574	D 27	1	0,5	—
D 26	1.220	486	—	D 28	3	1,2	0,7
D 29	1.072	432	320				
Moyenne			492	Moyenne			0,3

Les vitesses sont corrigées pour 28° en admettant que Q₁₀ = 3 et la correction pour la réduction non enzymatique du cytochrome *c* par le Co I H₂ est appliquée ; Co I H₂ 1,5 $\times$ 10⁻⁴ M ; cyanure 0,003 M ; tampon phosphate 0,05 M ; cytochrome *c* 2,2 $\times$ 10⁻⁵ M ; 0,03 cm³ de broyat dialysé ; pH 7,1.

Le broyat des « petites » ne montre aucune activité (fig. 29, tableau XXX). En effet, la vitesse de réduction du système complet (cyt. *c* + broyat 59 RA + Co I H₂) n'est pas plus grande que la somme des vitesses des réactions partielles (cyt. *c* + broyat 59 RA ; cyt. *c* + Co I H₂). En outre, l'activité du mélange des broyats 59 R + 59 RA n'est pas de façon significative différente de l'activité du broyat de 59 R seul. L'absence d'activité chez les « petites » n'est donc pas due à la présence d'un inhibiteur, mais à l'absence de l'enzyme. Si nous admettons que la Co I H₂-cytochrome *c*-réductase de la levure est formée des mêmes catalyseurs que celle du muscle cardiaque (v. schéma p. 108), il est le plus simple d'admettre que les « petites » manquent du facteur sensible au BAL. En effet, la pré-

sence dans les cellules de la diaphorase est indirectement démontrée par l'étude de la réduction du BM par le malate et par l'alcool (§§ 3.354 et 3.355), qui indique en plus que cette flavoprotéine n'est pas le facteur limitant la vitesse globale du système. L'interprétation selon laquelle les mutants manqueraient de facteur BAL est appuyée par la conclusion de SLATER (1950) que, dans le muscle, ce constituant limite la vitesse de la réduction du cytochrome *c* par le Co I H_2 . Comme on le verra plus loin (pp. 135 et 145), ce point de vue concorde très bien avec nos observations sur l'apparition parallèle, au cours de l'adaptation à l'oxygène, de la succino-cytochrome *c*-réductase et de la Co I H_2 -cytochrome *c*-réductase, le facteur BAL étant le seul constituant commun à ces deux systèmes.

3.36. *Localisation des enzymes à l'aide de la centrifugation fractionnée*

Ce paragraphe, qui termine l'étude comparée des levures normales et mutantes, est consacré à la localisation intracellulaire des enzymes d'oxydoréduction. Deux voies principales permettent d'aborder le problème de la distribution des enzymes dans le protoplasme, problème qui relie l'aspect physiologique à l'aspect morphologique de la cellule : l'une dérive des méthodes histologiques et cytologiques et remplace les techniques classiques par des réactions de plus en plus spécifiques (cf. LISON, 1936 ; GLICK, 1949) ; l'autre, plus récente, applique les techniques courantes de l'enzymologie aux fractions séparées de la cellule désintégrée (cf. CLAUDE, 1946 ; BRADFIELD, 1950 ; DOUNCE, 1950 ; SCHNEIDER et HOGEBOOM, 1951 ; GREEN, 1951). Plusieurs auteurs ont noté que certains ferments sont difficilement séparables des éléments figurés de la cellule (WARBURG, 1913 ; WILLSTÄTTER-« desmoenzymes »), tandis que d'autres ferments se trouvent apparemment dans la phase liquide du protoplasme (« lyoenzymes »). Au cours de la dernière décade, nos connaissances dans ce domaine ont rapidement progressé, grâce surtout aux travaux de BENSLEY, CLAUDE, BRACHET, CHANTRENNE, SCHNEIDER, HOGEBOOM, POTTER et GREEN. La centrifugation différentielle permet de séparer la masse protoplasmique en plusieurs fractions suffisamment pures et homogènes pour que leur contenu enzymatique puisse être analysé : noyaux cellulaires ; « gros granules » ou macrosomes ayant 0,5 à 3 μ de diamètre, sédimentables à 2 à 3.000 G et qui, dans certains cas, ont pu être identifiés avec les mitochondries ; « petits granules » ou microsomes, d'un diamètre de 0,05 à 0,2 μ , sédimentables par centrifugation prolongée à 18 à 20.000 G ; enfin, liquide surnageant qui se comporte comme une

TABLEAU XXXI

Composition enzymatique des fractions obtenues par centrifugation des broyats de 59 R et 59 RA. (Pour les détails, v. § 3.36.)

		59 R			59 RA		
		Broyat	Frac- tion G	Frac- tion S	Broyat	Frac- tion G	Frac- tion S
Azote	total (mg)	12,4	4,40	7,93	12,7	3,09	9,67
	% du total	100	35,5	64,0	100	24,3	76,1
	récupération en %		99,5			100,5	
Cytochrome oxydase	totale (mm ³ O ₂ /h)	3535	3793	50	0	0	0
	quand cyt. c = 3,6 × 10 ⁻⁵ M.						
	% du total	100	107	1			
	récupération en %		108				
	totale (mm ³ O ₂ /h)	8330	9417	12	0	0	0
	quand cyt. c = ∞						
	% du total	100	113	< 1			
	récupération en %		113				
	Q _{O₂} ^{cyt. c ∞} (N)	672	2140	2	0	0	0
Succino-cyt. c réductase	totale (mm ³ cyt.c/h)	1130	959	12	10		
	% du total	100	85	1			
	récupération en %		86				
	Q _{cyt. c} (N)	91	218	2	1		
α-glycéro-phosphate-cyt. c réductase	totale (mm ³ cyt.c/h)	1030	1021	79	0		
	% du total	100	99	7			
	récupération en %		106				
	Q _{α gl ph} ^{cyt. c} (N)	83	232	10	0		
Lactico-cyt. c réductase	totale (mm ³ cyt.c/h)	2660	378	2135	2879	198	2795
	% du total	100	14	81	100	7	97
	récupération en %		95			104	
	Q _{lactate} ^{cyt. c} (N)	214	86	270	226	64	289
Col H ₂ -cyt c réductase	totale (mm ³ cyt.c/h)	5360	4591	540	15		
	% du total	100	86	10			
	récupération en %		96				
	Q _{Col H₂} ^{cyt. c} (N)	432	1043	68	1		
Alcool-Col réductase	totale (mm ³ H ₂ /h)	1392	264	1044	1452	324	1332
	% du total	100	19	76	100	22	92
	récupération en %		95			114	
	Q _{alcool} ^{Col} (N)	112	60	132	114	105	138
Malico-Col réductase	totale (mm ³ H ₂ /h)	680	140	410	525	< 80	394
	% du total	100	20	60	100	< 15	76
	récupération en %		80			> 76	
	Q _{malate} ^{Col} (N)	55	32	52	41	< 26	41
Cytochrome c	total (g-atome Fe × 10 ⁻⁹)	6,7	< 1,2	6,0	9,1	< 1,2	8,1
	% du total	100	< 18	90	100	< 15	90
	récupération en %		> 90			> 90	
	g-atome Fe × 10 ⁻⁹ /mg N	0,54	< 0,27	0,76	0,72	< 0,39	0,95

Levures cultivées pendant 3 j.; milieu 1g, mode I.

Conditions des tests enzymatiques : voir légendes des tableaux XVIII, XXII, XXIV, XXVI, XXX; la réduction du coenzyme I est mesurée spectrophotométriquement à pH 7,1; volume total 3,0 cm³; substrat 0,017 M; tampon phosphate 0,05 M; KCN 0,002 M; Col 5,6 × 10⁻⁵ M. Les vitesses sont corrigées pour 28° en admettant un Q₁₀ = 2.

phase monodispersée dans un champ de force de l'ordre de 20 à 30.000 G. Etant donné le but limité de notre étude, nous n'entrons pas dans la description des résultats des nombreux travaux que l'on trouvera dans les mises au point citées plus haut. Il nous semble cependant nécessaire de souligner que : *a*) la composition des diverses fractions dépend en grande partie de la technique employée pour désintégrer la cellule et du milieu dans lequel les particules sont suspendues ; *b*) certains auteurs critiquent sévèrement la distinction entre macrosomes et microsomes, en tant que fractions homogènes (CHANTRENNE, 1947 ; JEENER, 1948) ; *c*) les recherches ont porté presque exclusivement sur des tissus de mammifères tels que le foie ou le rein.

Nous avons fractionné les broyats des levures normales et mutantes par centrifugation à froid (30.000 G pendant 1 heure). Après avoir siphonné le liquide surnageant (S_1), le culot (C_1) est resuspendu dans le tampon phosphate (0,1 M ; pH = 7,3) et recentrifugé. Le liquide S_1 , est recentrifugé en même temps et fournit le liquide surnageant S_2 et un très mince culot C_2 . L'eau de lavage (S_3) du culot C_1 et le liquide S_2 sont réunis et amenés à un volume double du volume initial du broyat (5 cm³). Les culots C_2 et C_3 (= particules C_1 lavées) sont réunis et amenés au même volume. On obtient ainsi trois préparations : broyat total, granules lavés (G) et liquide surnageant (S).

Les résultats des diverses mesures sont donnés dans le tableau XXXI. On y voit d'abord que la fraction sédimentable contient 24 % de l'azote du broyat chez 59 RA et 35 % chez 59 R. Cette différence n'est cependant pas significative car, dans d'autres expériences, la quantité d'azote de la fraction granulaire représentait 20 à 30 % de celle du broyat chez les deux souches. La distribution des activités, mesurées selon les techniques exposées précédemment, est très différente selon l'enzyme étudié. On distingue très nettement deux groupes de ferments : *a*) les enzymes dont presque toute l'activité (> 85 %) est liée à la fraction sédimentable et *b*) les enzymes dont presque toute l'activité (> 80 %) est liée à la fraction non sédimentable. Il est important de noter que chacun des huit enzymes testés se range soit dans une catégorie, soit dans l'autre sans qu'il y ait d'intermédiaires. La somme des activités des deux fractions correspond à 100 ± 14 % de la quantité d'enzymes présents dans le broyat non fractionné, ce qui montre l'absence d'inactivation par le traitement employé. Enfin, l'activité spécifique Q(N) de la fraction granulaire est supérieure à l'activité spécifique du broyat pour les desmoenzymes et inférieure à cette activité pour

les lyoenzymes. Les valeurs du $Q(N)$ de la fraction S se comportent d'une façon complémentaire. Autrement dit, la séparation des enzymes est préférentielle par rapport à la séparation des protéines non spécifiques.

La cytochrome-oxydase, les cytochromes *c*-réductases : succinique, de l' α -glycérophosphate et du $Co I H_2$, se trouvent dans la fraction sédimentable, tandis que la lactico-cytochrome *c*-réductase, les déshydrogénases malique et de l'alcool, et le cytochrome *c* sont contenus dans le liquide surnageant. Ces résultats concordent bien avec les données obtenues sur les cellules des mammifères. STERN (1939) et CHANTRENNE (1943) ont montré que la cytochrome-oxydase et la déshydrogénase succinique sont contenues électivement dans la fraction sédimentable. SCHNEIDER (1946) et HOGEBOM et coll. (1948) ont trouvé que les mitochondries renferment la presque totalité de ces deux enzymes. La $Co I H_2$ -cytochrome *c*-réductase est liée dans le foie en partie aux mitochondries, en partie aux microsomes (HOGEBOM, 1949). La localisation de l' α -glycérophosphate-déshydrogénase n'a pas été aussi bien étudiée que celle des enzymes précédents ; néanmoins les expériences de GREEN (1936) indiquent qu'elle est liée à des particules sédimentables. La présence de l'alcool-déshydrogénase dans le liquide surnageant est en accord avec les résultats de LE PAGE et SCHNEIDER (1948) qui ont observé que le système glycolytique n'est pas sédimentable. Il en est de même pour la déshydrogénase lactique pour laquelle des résultats semblables aux nôtres ont été obtenus par CHANTRENNE (1943). La présence dans le liquide surnageant des 4/5 de la déshydrogénase malique et du cytochrome *c*, même après deux centrifugations d'une heure à 30.000 G, nécessite quelques remarques. GREEN et coll. (cf. GREEN, 1951) ont étudié intensivement des préparations de tissus animaux contenant tous les catalyseurs du cycle des acides tricarboxyliques. Les enzymes, dont l'un est la malico-déshydrogénase, et les coenzymes sont liés d'une façon organisée (cyclophorase) à des « gros granules ». Des petites modifications du traitement employé pour préparer la « cyclophorase » peuvent rompre complètement son intégrité causant ainsi le départ dans la phase liquide de plusieurs enzymes. Il est possible qu'un artefact de ce genre soit à la base de la différence entre les résultats de GREEN et les nôtres. Il nous semble cependant plus probable qu'elle soit due aux différences dans le matériel biologique étudié, l'existence du cycle tricarboxylique chez la levure étant très controversée (cf. KREBS, 1943, 1949).

La distribution du cytochrome *c* a été étudiée par SCHNEIDER et

coll. (1948) et par SCHNEIDER et HOGEBOM (1950). Ces auteurs ont montré qu'elle dépend dans une large mesure de la nature du milieu dans lequel on effectue la séparation : dans des milieux hypotoniques la plus grande partie du cytochrome *c* se trouve dans la phase liquide, tandis que dans les milieux isotoniques les mitochondries en renferment plus de la moitié. BEINERT (1951), en utilisant le cytochrome marqué par le Fe radioactif, a trouvé une notable redistribution qui résulte de l'adsorption par les particules du cytochrome *c* du liquide surnageant. TSOU est arrivé (1951 *c*) à la même conclusion et il a montré que le cytochrome *c* adsorbé possède une activité catalytique beaucoup plus grande que le cytochrome *c* en solution.

Le fait le plus marquant de la comparaison de la localisation des enzymes chez les « grandes » et chez les « petites » est l'absence chez ces dernières des enzymes sédimentables et la présence de tous les lyoenzymes. Comme on voit dans le tableau XXXI, la fraction G des mutants est apparemment dépourvue de toute activité enzymatique. Nous discuterons plus loin (p. 123) la signification de ces résultats.

3.37. Discussion et conclusions du chapitre 3.3

1. L'étude spectroscopique des cellules intactes, ainsi que l'étude des systèmes enzymatiques isolés montrent que la respiration « terminale » des levures normales (« grandes ») suit un schéma essentiellement analogue à celui de la respiration des tissus animaux. Les cellules de levure montrent le spectre d'absorption classique, avec les bandes des cytochromes *a*, *b*, *c* et *e*. L'emploi d'un type de préparation enzymatique nouveau dans le cas de la levure (« broyat »), a permis d'améliorer considérablement (10 à 100 fois selon l'enzyme) le rendement de l'extraction de plusieurs enzymes. La présence, dans le broyat des « grandes », des enzymes catalysant les réactions suivantes a été clairement établie : succinate $\rightarrow$ O₂ ; lactate $\rightarrow$ O₂ ; cyt. *c* $\rightarrow$ O₂ ; lactate $\rightarrow$ cyt. *c* ; succinate $\rightarrow$ cyt. *c* ; α -glycérophosphate $\rightarrow$ cyt. *c* ; malate $\rightarrow$ Co I ; alcool $\rightarrow$ Co I ; Co I H₂ $\rightarrow$ cyt. *c*, et leur activité a été mesurée dans des systèmes reconstitués *in vitro*. Il ressort de cette étude que la cytochrome-oxydase de la levure se comporte d'une façon tout à fait semblable aux préparations classiques d'origine animale et que l'activité *in vitro* de cet enzyme peut rendre compte de la totalité de la respiration. Il en est autrement pour le chaînon succinate $\rightarrow$ cyt. *c*. Dans les tissus animaux, l'oxydation du succinate peut représenter une des voies principales de la respiration, car sa vitesse *in vitro* est du même ordre de grandeur que celle de l'oxydation du cyto-

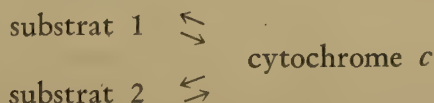
chrome *c* (KEILIN et HARTREE, 1940) ou du Co I H_2 (SLATER, 1950). Dans le broyat de levure, la vitesse d'oxydation du succinate est environ dix fois moindre que celle de l'oxydation du Co I H_2 et environ vingt fois moindre que celle de l'oxydation du cytochrome *c*. Cette observation concorde bien avec les données de KLEINZELLER (1941) qui a trouvé que la levure contient de grandes quantités de succinate, ce qui s'expliquerait par l'accumulation de ce métabolite, dont la dégradation serait très lente. Il semble donc que, chez la levure, les cycles respiratoires dont l'acide succinique fait partie, ne soient pas responsables du transfert principal d'hydrogène catabolique vers le cytochrome *c*. Cependant la participation de l'acide succinique aux synthèses couplées à la respiration reste entièrement possible. La voie principale du catabolisme respiratoire peut passer chez la levure par la Co I H_2 -cytochrome *c*-réductase ou la lactico-cytochrome *c*-réductase.

2. La constitution enzymatique des « petites » est profondément différente de la constitution de la race normale, cultivée dans les conditions identiques, en aérobiose. La différence porte sur plusieurs catalyseurs de la respiration. Les cytochromes *a*, *b* et vraisemblablement *e*, sont absents. Une faible bande α du cytochrome a_1 est visible chez le mutant, alors qu'elle n'est pas décelable chez les « grandes ». L'activité des réactions : $\text{cyt. } c \rightarrow \text{O}_2$, $\text{succinate} \rightarrow \text{cyt. } c$, $\text{Co I H}_2 \rightarrow \text{cyt. } c$ et α -glycérophosphate $\rightarrow \text{cyt. } c$ est nulle ou très faible, et ce manque d'activité n'est pas dû à la présence d'inhibiteurs, mais à l'absence des catalyseurs. Les enzymes qui catalysent les réactions considérées sont-ils complètement absents ? La réponse dépend évidemment de la sensibilité des techniques employées ; comme on verra plus loin (§ 4.31), il est possible de déceler des activités plusieurs centaines de fois plus faibles que celles de la souche normale. Il en résulte que les mutants possèdent tout au plus 1/1000 de la cytochrome-oxydase des « grandes » et tout indique qu'elle fait totalement défaut. Ce fait explique la déficience respiratoire des cellules intactes du mutant, décrite au paragraphe 3.2. Les activités de certains systèmes enzymatiques présentent des différences lorsqu'on les compare chez les « grandes » et chez les « petites ». Chez ces dernières le système $\text{malate} \rightarrow \text{Co I}$ est environ deux fois moins actif, alors que la vitesse de la réaction $\text{alcool} \rightarrow \text{Co I}$ est environ trois fois plus élevée. Ces différences quantitatives sont à notre avis des corollaires de la déficience respiratoire principale qui porte sur les enzymes héminiques. On verra dans le chapitre 4 que ce point de vue est justifié par l'étude des variations de la teneur en enzymes oxydant le malate et l'alcool, en fonction de l'aération de la levure.

Les variations génotypiques sont parallèles aux variations phénotypiques. Enfin, les broyats des « petites » sont capables d'effectuer une réaction qui n'a pas lieu dans les levures normales : la réduction directe du cytochrome *c* par le malate, en absence de Co I.

Certains traits du métabolisme (cf. § 3.25) et du spectre des « petites » rapprochent les mutants étudiés ici et la levure résistante au KCN (CASTOR, 1939 ; STIER et CASTOR, 1941), ainsi que des souches isolées à l'occasion d'un traitement par l'oxyde d'éthylène (WHELTON et PHAFF ⁽¹⁾, 1947). Il est évident que seule une étude détaillée de la constitution enzymatique de ces souches permettra de les identifier avec les « petites » étudiées ici. Il serait d'autre part très intéressant de savoir si les agents employés (KCN et C₂H₄O) par les auteurs cités, agissent comme l'acri flavine en tant que mutagènes ou, au contraire, comme des facteurs de sélection des mutants spontanés.

3. Les « petites » forment au moins autant de cytochrome *c* et de lactico-cytochrome *c*-réductase que les « grandes ». Au sein de la cellule, leur cytochrome *c* se trouve constamment à l'état réduit et ne semble pas participer aux oxydoréductions qui mènent vers l'O₂. Extrait de la cellule, le cytochrome *c* des « petites » est identique, au point de vue spectroscopique et catalytique, au cytochrome *c* des levures normales et du muscle. Ceci pose un problème particulièrement intéressant : quels sont les rôles du cytochrome *c* et de la lactico-cytochrome *c*-réductase chez les mutants ? Si, en accord avec le principe que chaque enzyme ne possède qu'une seule fonction spécifique, nous admettons que la seule fonction physiologique du cytochrome *c* est d'être oxydé par la cytochrome-oxydase, il faut conclure qu'environ 1 % des protéines synthétisées sont *sans aucune utilité pour les mutants*. Il en est de même pour l'oxydation du lactate, car, l'enzyme étant indépendant des coenzymes, la réduction du cytochrome *c* doit aboutir à une impasse. Si on se place, au contraire, à un point de vue téléologique, on doit chercher la fonction jouée par le cytochrome *c* chez les « petites ». On peut penser qu'il représente un chaînon intermédiaire commun aux différentes déshydrogénases qui s'en servent comme accepteur :



Un tel mécanisme serait analogue aux oxydoréductions anaérobies

(1) M. PHAFF nous a communiqué que sa souche mutante est dépourvue de cytochrome b et non de c, comme il était dit par erreur dans la publication en question.

couplées par les coenzymes I ou II, ou à l'oxydation du Co I H_2 par le fumarate par l'intermédiaire du cytochrome *b* (cf. §§ 3.3 et 3.356). Il est, d'autre part, nécessaire d'étendre l'étude de la composition enzymatique des mutants à la cytochrome *c*-peroxydase ALTSCHUL et coll., 1940 ; ABRAMS et coll., 1942). Si cet enzyme est présent, le cytochrome *c* s'insérerait chez les « petites » dans un système non-interrompu, dont la signification physiologique resterait cependant à déterminer.

4. Quel est le mécanisme qui aboutit, chez le mutant, à un changement si profond de la constitution enzymatique ? On peut penser que l'effet primaire de la mutation consiste à modifier le déroulement normal de la biosynthèse des hémoprotéines. En effet, l'absence de la cytochrome-oxydase peut être expliquée par la non-formation du cytochrome a_3 (qui accompagne invariablement le constituant *a*), l'absence de la succino-cytochrome *c*-réductase par celle du cytochrome *b*, et l'absence de l'enzyme oxydant le Co I H_2 par l'absence du facteur sensible au BAL. La nature héminique de ce dernier n'est pas établie, mais les expériences de SLATER (1950) suggèrent une telle possibilité. En outre, le cytochrome *e* n'existe vraisemblablement pas chez les « petites ». Il est tentant de penser, par analogie avec les systèmes mentionnés plus haut et en accord avec les données de KEILIN et HARTREE (1949) qui montrent que le potentiel du cytochrome *e* est plus bas que celui du cytochrome *c*, que le cytochrome *e* est identique au facteur sensible au BAL, intermédiaire entre le Co I H_2 et le cytochrome *c*.

Les « petites » n'effectuent pas la synthèse d'un certain nombre d'hémoprotéines. Cette déficience peut être due soit à ce que les mutants ne peuvent synthétiser les groupements prosthétiques, soit à ce qu'ils ne peuvent former les copules protéiques. Envisageons la première hypothèse. Les « petites » effectuent la synthèse du noyau héminique puisqu'elles contiennent le cytochrome *c*, mais on peut penser que la mutation affecte en premier lieu la formation des hèmes *a* et *b*, sans influencer celle des apoenzymes correspondants. Les faits suivants montrent cependant qu'il n'en est pas ainsi : *a*) les mutants possèdent le cytochrome a_1 dont la bande α est à $580 \text{ m}\mu$ environ. La position de cette bande est très proche de celle de l'hémochromogène pyridinique de l'hème *a* (v. tableau XIV), ce qui indique que les « petites » synthétisent le groupement prosthétique de la cytochrome-oxydase, mais sont incapables de former l'apoenzyme. L'hème *a* s'accumulerait donc chez les mutants sous forme d'un complexe catalytiquement inactif (cyt. a_1) comme chez les levures de brasserie basses (FINK, 1932 ; KEILIN, 1936),

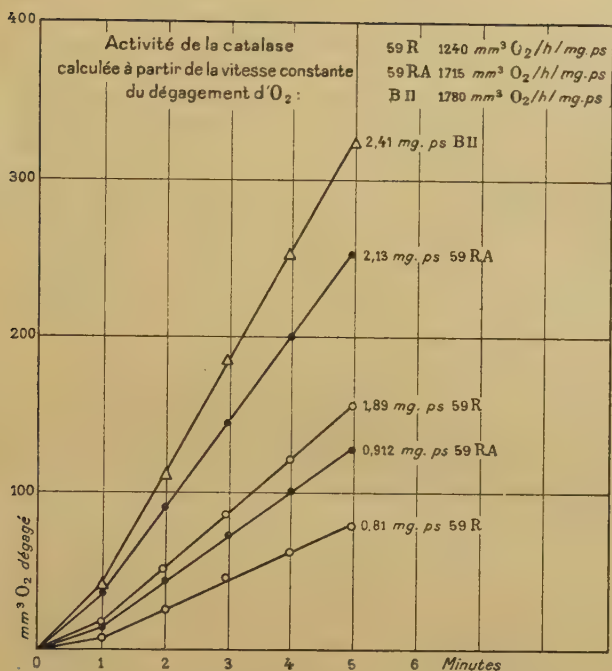


Fig. 30. — *Activité de la catalase chez les « grandes » et « chez les petites ».*

Méthode de FUJITA et KODAMA (1931) ; 28° ; 2 cm³ de suspension cellulaire dans KH₂PO₄ M/15 ; 72 μ moles H₂O₂ ajoutés au temps zéro ; le thermobaromètre contient de l'eau oxygénée ; levures cultivées pendant 3 jours sur milieu 1g, mode I.

chez la levure de boulangerie cultivée en anaérobiose (v. § 4.6) et chez certaines bactéries (FREI et coll., 1934 ; FUJITA et coll.) ; *b*) Tout indique que le protohème est le groupement prosthétique du cytochrome *b* (cf. LEMBERG et LEGGE, 1949). Les « petites » effectuent la synthèse du protohème comme le montrent les dosages du protohémochromogène pyridinique (tableau XXXII). Elles sont capables, non seulement de synthétiser le protohème, mais aussi de former la catalase dont il constitue le groupement prosthétique (cf. SUMNER, 1941), c'est-à-dire d'effectuer le couplage entre l'apoenzyme et le coenzyme. En effet, l'activité de la catalase est sensiblement la même chez les deux races (fig. 30). Il faut donc conclure que la non-formation du cytochrome *b* est due à l'absence de la protéine spécifique *b*. Notons cependant que le problème de la biosynthèse des hémoprotéines est très complexe et il est possible qu'il existe une relation étroite entre la formation de l'apoenzyme

TABLEAU XXXII

Distribution du Fer organique chez 59 R et 59 RA.

	59 R	59 RA	remarques
Fe organique (μ g-atome/g N)	4,2	3,1	dosage selon § 2,72
Fe du protohème (idem)	2,8	1,1	dosage selon § 2,6
Fe du cytochrome <i>c</i> (idem)	1,1	1,6	dosage selon § 2,6
Fe du cytochrome <i>b</i> (idem)	0,8	0	voir (*).

Levure cultivée pendant 3 j. sur du milieu 1g, mode I.

et celle du groupement prosthétique. Examinons le tableau XXXII qui indique la distribution du Fer organique chez la levure. On y voit d'abord que l'estimation chimique de la teneur en Fer organique concorde bien avec les dosages spectroscopiques *in situ*, car la somme du protohème et du cytochrome *c* est sensiblement égale à la valeur du Fer organique total ⁽¹⁾. Il en résulte que la levure contient relativement peu ($< 0,3 \mu$ g-atome Fe/g N) d'hémines autres que celles à noyau protoporphyrinique. Cette conclusion est en accord avec les estimations de WARBURG et KUBOWITZ (1928) qui ont déduit du spectre du complexe « ferment respiratoire »-CO que la teneur maxima possible en « Atmungsferment » d'une levure de boulangerie était inférieure à $0,1 \mu$ g-atome Fe/g N. En outre, on constate que, chez les « grandes », le cytochrome *b* représente seulement 1/4 à 1/3 du protohème total. On ignore les concentrations exactes des autres substances protohémiques, telles que la catalase (vraisemblablement : $< 0,01 \mu$ g-atome Fe/g N, cf. HAND, 1933), la peroxydase typique, dont l'existence chez la levure n'est même pas certaine, la cytochrome *c*-peroxydase (environ $0,03 \mu$ g-atome

(*) On ne peut pas doser le cytochrome *b* parce qu'on ne connaît pas son ϵ_m . Cependant, on peut estimer approximativement sa teneur, en supposant que son ϵ_m n'est pas très différent de ceux du cytochrome *c* et du protohémochromogène pyridinique (cf. SLATER, 1949). Cette supposition semble justifiée, car les valeurs de ϵ_{mm} de la bande α des hémochromogènes proto- ou mésoporphyriniques sont voisines : protopyridine 31 à 35, protoglobine dénaturée 31, mesopyridine 33, cyt. *c* 26 à 28 (cf. LEMBERG et LEGGE, 1949). L'estimation du cytochrome *b* est fondée sur la compensation de l'intensité de la bande αb avec une solution titrée de protohémochromogène pyridinique.

(1) Le problème de la teneur de la levure en hémines est loin d'être résolu (cf. HAND, 1933 ; SCARISERICK, 1947). Il nous semble que la cause principale des discordances peut être rapportée aux variations du matériel biologique. Les valeurs que nous avons trouvées sont tout à fait analogues à celles trouvées par ANSON et MIRSKY (1928) chez une levure de boulangerie (env. 5μ g-atomes Fe/g N) et supérieures à celles obtenues par EULER et coll. (1927) chez une levure de brasserie ($0,7$ à $1,1 \mu$ g-atome Fe/g N). On verra par la suite (§ 4.31) que la levure de boulangerie cultivée en anaérobiose contient moins d'hémines et se rapproche par ses propriétés métaboliques des levures basses de brasserie. Ce fait peut expliquer la différence entre les résultats des auteurs suédois et les nôtres.

Fe/g N d'après ALTSCHUL et coll., 1940-1942) et le cytochrome b_2 (0,05 à 0,1 μ g-atome Fe/g N d'après BACH et coll., 1946). Il semble cependant certain que ces substances ne rendent pas compte des 2/3 du protohème (environ 2 μ g-atome Fe/g N) qui ne sont pas le cytochrome b . Il paraît donc évident que la levure contient une quantité considérable de protohème sous une forme inconnue. KEILIN (1925-1926) suggéra d'abord qu'il s'agissait d'hémine libre, mais cette interprétation ne semble pas devoir être retenue, car il est peu probable que les hémines puissent exister dans la cellule vivante sous forme non couplée et parce que, d'autre part, l'hématine libre inhibe les oxydations cellulaires, surtout celles de l'acide succinique (KEILIN et HARTREE, 1947). Ce que nous observons chez la levure est d'ailleurs tout à fait semblable à ce qui a été trouvé dans le muscle cardiaque. Dans ce matériel, le cytochrome b représente 1/3 du protohème total et la nature du reste (1,2 μ g-atome Fe/g ps, SLATER, 1949) n'est pas connue. SLATER (1950) pense qu'une certaine partie de ce protohème (20 % environ) revient au facteur sensible au BAL. Comparons l'image de la distribution des hémines de la souche normale avec celle du mutant (tableau XXXII). La mutation a pour effet de diminuer la concentration du Fer organique et surtout d'abaisser celle du protohème total. Cette dernière baisse est légèrement compensée par l'accroissement de la teneur en cytochrome c et on peut penser que, chez la « petite », le protohème, disponible à la suite de la non-formation de la protéine spécifique b , est repris pour former le cytochrome c . Cependant, cette compensation n'est que partielle, et la somme *protohème + cytochrome c* chez le mutant est inférieure à la somme correspondante chez la souche normale. Tout se passe donc comme si la mutation avait pour effet primaire la suppression de la formation des protéines spécifiques, et comme si l'intensité de la biosynthèse des hémines, ainsi que leur distribution, n'étaient affectées que secondairement. On verra plus bas (§§ 4.52 et 4.54) ce que nous apporte à cet égard l'étude de l'excrétion des porphyrines libres.

5. On a vu plus haut l'intérêt que présentent les « petites » pour l'étude de la biosynthèse des enzymes hémoprotéiques. Nous voulons dégager maintenant un autre problème biochimique à la solution duquel les recherches sur les « petites » peuvent apporter une aide précieuse. Afin de comprendre l'ensemble des processus cellulaires le biochimiste commence par l'étude des systèmes isolés. Il arrive à isoler une réaction, soit par extraction des enzymes et leur étude *in vitro*, soit *in vivo*, en employant des inhibiteurs spécifiques. La dernière décade a apporté deux nouvelles méthodes, à savoir

l'emploi des isotopes et des mutants biochimiques. Il est inutile de rappeler les résultats obtenus grâce à cette dernière technique (cf. les mises au point de BEADLE, 1945 ; HOROWITZ, 1950 ; CATCHESIDE, 1951), mais il importe de souligner que la presque totalité des travaux porte sur un aspect particulier du métabolisme, notamment sur celui affecté chez les mutants exigeant pour proliférer un acide aminé ou un facteur de croissance. Les mutations affectant le métabolisme intermédiaire des glucides ont à peine été utilisées. Les « petites » sont un matériel idéal pour des recherches sur le mécanisme et le rôle physiologique de la respiration non-héminique, puisqu'elles sont dépourvues de cytochrome-oxydase et, malgré cela, respirent les corps en C_2 à C_6 (cf. § 3.22). Cette voie respiratoire est très peu connue et représente, selon certains auteurs (cf. OPARIN, 1938 ; BARRON, 1943), le système phylogénétiquement primitif. En outre, l'absence chez les « petites » de la succino-déshydrogénase doit permettre de reprendre d'une façon nouvelle la question tant controversée des cycles des acides di- et tricarboxyliques chez la levure (cf. KREBS, 1943 ; MARTIUS et LYNEN, 1950). Par exemple, si le cycle de l'acide citrique existe chez la levure normale et si la succino-déshydrogénase est le seul enzyme activant le succinate, les « petites » devraient accumuler le succinate et les métabolites dont la dégradation aboutit à la formation de ce corps. Si, au contraire, les mutants en question étaient capables de métaboliser l'acide succinique, cela indiquerait l'existence d'un autre système enzymatique, différent de la succino-déshydrogénase classique.

6. L'étude génétique des mutants « petite colonie » (EPHRUSSI et coll., 1949 ; CHEN et coll., 1950), ainsi que l'analyse de la transformation des populations de levure en présence d'acriflavine (EPHRUSSI et coll., 1949 ; EPHRUSSI et HOTTINGUER, 1950) ont conduit à l'hypothèse de l'existence, dans le cytoplasme des levures normales, d'un facteur autoreproductible corpusculaire dont la perte ou la mutation caractérise les cellules mutantes étudiées ici. Nous voudrions essayer maintenant de voir comment les résultats de notre étude physiologique cadrent avec cette interprétation.

La mutation aboutit à un remaniement profond de la structure enzymatique de la cellule, et présente un effet pléiotrope. Ce remaniement est dû à une déviation de la synthèse normale de plusieurs enzymes respiratoires et nous avons discuté plus haut (4) l'interprétation selon laquelle la formation des protéines spécifiques serait modifiée en premier lieu et non celle des tétrapyrroles. Lorsqu'on compare la position qu'un enzyme donné occupe dans la chaîne des oxydoréductions menant vers l' O_2 avec l'amplitude de ses variations

dues à la mutation, on ne constate aucune corrélation. La cytochrome-oxydase et la Co I H_2 -cytochrome *c*-réductase sont absentes, alors que le cytochrome *c* qui leur sert d'intermédiaire est présent ; les cytochrome *c*-réductases, succinique et de l' α -glycérophosphate, sont absentes alors que celle de l'acide lactique est présente. Il en est tout autrement pour la déviation de la synthèse de ces mêmes enzymes à la suite de la prolifération en anaérobiose (v. chapitre 4) : dans ce cas on observe un véritable gradient de l'amplitude des variations, gradient parallèle au potentiel d'oxydo-réduction (§ 4.6).

Le seul trait commun des catalyseurs dont la synthèse est supprimée par la mutation est leur localisation dans des particules sédimentables et cette corrélation est renforcée par le fait que la formation des lyoenzymes respiratoires est très peu influencée par la mutation (§ 3.36). Cette constatation pose le problème abordé précédemment dans les publications de SLONIMSKI et EPHRUSSI (1949), EPHRUSSI et coll. (1949) et EPHRUSSI (1952) de l'identité du facteur héréditaire cytoplasmique, soit avec les granules sédimentables portant les quatre enzymes disparus chez le mutant, soit avec les quatre apoenzymes ou leur précurseur commun. Une quatrième entité, qui doit être prise en considération, est révélée par l'examen microscopique des cellules.

KEILIN (1929) a observé que la réaction du « Nadi » a lieu à l'intérieur des cellules de levure. Nous avons également constaté que le bleu d'indophénol qui se forme dans les cellules normales est concentré dans les granules cytoplasmiques. Ces granules, dont le nombre est variable d'une cellule à l'autre (0 à 50), mesurent de 0,3 à 1,0 μ . A côté de ces granules colorés, on observe, dans les « grandes », de nombreux granules incolores que rien, en dehors de la couleur, ne permet de distinguer des premiers. D'autre part, on trouve dans une population de « grandes » quelques cellules ne contenant pas de granules colorables. L'examen, dans les mêmes conditions, d'une suspension de « petites », ne révèle que des granules incolores.

Peut-on considérer ces quatre entités corpusculaires comme identiques ?

Les granules bleus sont vraisemblablement distincts du facteur génétique et des enzymes. En effet, si on suspend les cellules « petites » dans une solution de bleu d'indophénol, on constate la coloration des granules intracellulaires. Il est donc beaucoup plus probable que les « petites » ont perdu la faculté de former le colorant et non les récepteurs de ce dernier. Il est d'ailleurs connu depuis

ZWEIBAUM et MANGENOT (1923) que le bleu d'indophénol des solutions vieilles de « Nadi » peut servir à colorer histologiquement les lipides (cf. LISON, 1936).

Les enzymes eux-mêmes sont certainement distincts du facteur génétique. Ceci est prouvé par le fait que les « grandes » qui ont proliféré en anaérobiose sont dépourvues des quatre enzymes caractéristiques, mais possèdent toujours le facteur héréditaire (v. § 4.31). L'étude des « petites ségrégantes » (résultant de la mutation génique) fournit une preuve supplémentaire, car ces « petites » possèdent le facteur héréditaire cytoplasmique, mais ne contiennent pas de cytochrome-oxydase (CHEN et coll., 1950).

La question de la relation entre les granules sédimentables et les enzymes est plus difficile à trancher pour plusieurs raisons. *a*) Les quatre enzymes qui manquent chez la « petite » n'ont pas été obtenus jusqu'à présent à l'état pur. STERN (1939) n'a pas réussi à séparer la cytochrome-oxydase de la succino-déshydrogénase par ultracentrifugation ou par électrophorèse. Il pense que les deux ferments sont situés côte à côte sur le même granule, assurant ainsi un meilleur rendement des processus respiratoires, à moins que la partie apoenzymatique ne soit commune aux deux ferments. Plusieurs auteurs ont souligné que l'activité enzymatique est influencée si profondément par l'intégrité de la structure colloïdale de la préparation (KEILIN et HARTREE, SZENT-GYÖRGYI, KEILIN et MANN, GREEN) que dans certains cas on peut considérer l'enzyme pur comme un artefact (DANIELLI, 1951). On doit espérer que les tentatives de séparation à l'aide de corps tensio-actifs ou de solvants organiques (STRAUB, 1941 ; WAINIO et coll., 1948, 1950 ; MORTON, 1950) aboutiront à une meilleure compréhension des relations entre les particules et l'enzyme. *b*) La fraction G (v. § 3.36) qui contient tous les desmoenzymes des « grandes » est vraisemblablement hétérogène. Si la situation chez la levure est analogue à celle des tissus animaux, cette fraction est constituée par un mélange de macromosomes et de microsomes. Nous avons effectué quelques expériences sur la teneur relative en cytochrome-oxydase de la fraction sédimentable à 3.000 G et de la fraction sédimentable à 18.000 G (centrifugation de 30 min.). La première fraction semble contenir plus d'enzyme que la deuxième. Il faut noter cependant que les techniques de préparation du broyat et de mesure de l'activité étaient différentes et moins sûres (SLONIMSKI et EPHRUSSI, 1949) que celles utilisées dans le présent travail, et que la récupération de l'activité enzymatique était bien inférieure à 100 %. Il serait intéressant de reprendre le problème de la répartition des quatre desmoenzymes

entre les « gros » et « petits » granules avec des critères qui sont de rigueur dans ce domaine (cf. SCHNEIDER, 1949 ; POTTER, 1951).
c) La fraction sédimentable de la levure mutante contient approximativement autant d'azote que celle des souches normales. L'explication la plus simple serait donc d'admettre que seuls les enzymes ont disparu, mais que les granules qui les portent chez les « grandes » persistent chez le mutant. Il est pourtant évident que, si la fraction granulaire est hétérogène, la disparition d'une espèce de particules peut ne se répercuter que très faiblement sur la quantité de protéines de toute la fraction. Il serait très important de savoir si la fraction G des « petites » est dépourvue de tous les enzymes ou si certains desmoenzymes (phosphatases, p. ex.) y sont présents. Une telle étude pourra nous renseigner sur l'hétérogénéité de la population intracellulaire de granules, problème important du point de vue de la physiologie cellulaire et de la génétique.

Il ressort de cette discussion que le facteur cytoplasmique héréditaire postulé par EPHRUSSI et ses collaborateurs peut être identique aux granules sédimentables ou à une fraction de ceux-ci. Le problème de savoir si la mutation « petite colonie » consiste dans la perte de ce facteur ou dans sa mutation, se pose sur le plan biochimique de la façon suivante : peut-on distinguer la perte de granules sédimentables de la perte des enzymes, non accompagnée de la perte des granules.

Il serait du plus haut intérêt d'effectuer une analyse poussée des « petites ségrégantes » chez lesquelles la respiration est abolie à la suite d'une mutation génique (CHEN et coll., 1950 ; EPHRUSSI et HOTTINGUER, 1951). Ces mutants contiennent le facteur cytoplasmique dont la fonction hétérocatalytique est supprimée. La comparaison des fractions sédimentables des « petites cytoplasmiques » et « géniques » pourrait être très fructueuse dans l'élucidation de la nature de ce facteur. De même, la comparaison des fractions sédimentables des « grandes » et des « petites » cultivées en anaérobiose serait très intéressante, car, dans ces conditions, leur constitution enzymatique est identique (v. §§ 4.3 et 4.4), mais les premières contiennent seules le facteur cytoplasmique héréditaire.

4. RÔLE D'UN FACTEUR DU MILIEU EXTÉRIEUR DANS LA FORMATION DES ENZYMES : ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OXYGÈNE

4.1. INTRODUCTION

Dans le chapitre III, nous avons décrit les variations de l'équipement en enzymes respiratoires de deux types de levures différant par le génotype. Nous allons étudier maintenant les variations de cet équipement en fonction du milieu extérieur.

Plusieurs auteurs ont essayé d'établir le rôle joué par l'oxygène dans le déterminisme du potentiel métabolique de la levure, mais leurs résultats sont souvent difficiles à interpréter, et parfois contradictoires. MEYERHOF (1925) a observé que le faible Q_{O_2} des levures de bière augmente en présence d'air et de sucre. Cependant, il a obtenu un effet analogue dans l'azote, d'où il a conclu que l'oxygène était sans importance et que l'augmentation du pouvoir respiratoire était corollaire de l'augmentation générale de l'intensité métabolique en présence de sucre. Le même point de vue est adopté par TRAUTWEIN et WASSERMAN (1930), selon qui les intensités du métabolisme fermentaire et respiratoire vont de pair, et le remplacement de l'un par l'autre n'a pas lieu. WINDISCH (1932) soutient un point de vue encore plus extrême : selon cet auteur, la culture en anaérobiose augmente le pouvoir respiratoire de la levure, tandis que la culture en présence d'air le diminue. Notons cependant que les techniques de WINDISCH ont été sévèrement critiquées par HOOGERHEIDE (1935). Enfin, GALE (1939) n'a trouvé aucun changement du spectre des cytochromes chez *E. coli* après culture prolongée en anaérobiose.

L'opinion contraire, selon laquelle la présence d'oxygène stimule le développement du pouvoir respiratoire, est généralement admise (cf. KEILIN, 1943 ; STEPHENSON, 1949 ; GALE, 1951), bien que le mécanisme du phénomène ait reçu très peu d'attention. WARBURG (1927) constate que les levures cultivées au laboratoire respirent moins intensément que la levure de boulangerie du commerce, fortement aérée pendant la fabrication. BERAUD (1939-1940) compare des levures de vins cultivées sur des milieux solides avec celles cul-

tivées dans des milieux liquides, et observe que, chez les premières, la respiration est plus active et le spectre des cytochromes plus net. FINK (1932), ELION (1936), EULER et coll. (1939), BOREI et SJÖDEN (1943) ont attribué à la pression d'oxygène au cours de la croissance les différences qu'ils ont observées entre diverses levures de brasserie et de boulangerie quant à l'intensité de la respiration et à la structure du spectre des cytochromes. FINK et BERWALD (1933) ont décrit la « transformation » de la levure de brasserie basse en levure de boulangerie par culture prolongée en aérobiose. Il est malheureusement difficile de départager, dans les résultats des auteurs cités, ce qui revient aux différences héréditaires et aux différences des conditions de culture, car : *a*) les levures utilisées par ces chercheurs (levures de brasserie basses et hautes, levures de boulangerie) représentent le plus souvent des races, sinon des espèces différentes ; *b*) les conditions des expériences étaient parfois extrêmement favorables à la sélection de mutants spontanés (p. ex., la « transformation » décrite par FINK et BERWALD (*l. c.*) a eu lieu après plusieurs mois de culture). On est donc en droit de penser que les différences observées étaient dues en dernière analyse au changement du génotype prédominant dans la culture. Il n'existe, à notre connaissance, aucun travail où les variations que peut subir le système respiratoire d'une levure ont été établies dans des conditions qui excluent les modifications génotypiques de celle-ci et qui ne diffèrent que par le degré d'aération. C'est ce que nous nous sommes proposé de réaliser. On verra que les variations phénotypiques de la constitution du système respiratoire que nous avons observées permettent de mieux comprendre les variations dues à la perte du facteur cytoplasmique héréditaire.

4.2. CROISSANCE EN ANAÉROBIOSE ET EN AÉROBIOSE

Nos expériences sur la croissance anaérobie et aérobie des levures avaient un but limité. Il s'agissait de trouver des conditions de culture permettant d'obtenir une récolte abondante (quelques grammes de poids sec), et facilement contrôlables (atmosphère, phase de la croissance, pH et composition du milieu). Cependant, au cours d'expériences préliminaires, nous nous sommes aperçus que la multiplication anaérobie représentait un phénomène beaucoup plus complexe que la multiplication en présence d'oxygène et que certaines de ses caractéristiques pouvaient éclairer le problème principal de notre travail : le mécanisme de la formation des enzymes de la respiration et de la fermentation.

Selon TAVLITZKI (1949), les souches B II, 59 R, RA et Rp

peuvent être entretenues indéfiniment en aérobiose dans le milieu synthétique 4, qui ne contient, comme facteurs de croissance, que la biotine et la β -alanine : l'addition d'autres vitamines n'influence pas le rendement réel ⁽¹⁾. Dans ce milieu, l'arrêt de la croissance aérobie est déterminé par l'épuisement du sucre quand sa concentration initiale ne dépasse pas 0,3 %. Nous avons confirmé ce dernier fait. En ce qui concerne l'anaérobiose, nous avons trouvé que les concentrations en sucre supérieures à 0,1 % n'augmentent que très peu la croissance maxima et que l'arrêt de la multiplication est déterminé par autre chose que la carence en aliment carboné. Quelle que soit la concentration en sucre, la croissance s'arrête aux environs de d. o. = 200 ⁽²⁾. Lorsqu'on enrichit le milieu synthétique minimum par addition de plusieurs vitamines (milieu 5), on augmente sensiblement la croissance maxima. Comme le montrent la figure 42 et le tableau XLIII, la croissance maxima anaérobie peut atteindre dans ce milieu une d. o. = 1.400 à 2.000. La figure 42 est très instructive. Elle montre qu'en présence d'air le rendement de croissance est constant jusqu'à la concentration de glucose de 1 %, et que l'arrêt de multiplication est dû à l'épuisement du sucre. Dans le même milieu, en anaérobiose, la relation entre la teneur initiale en sucre et la croissance maxima n'est pourtant pas linéaire et on n'arrive pas à dépasser une d. o. = 1.800. Enfin, dans le milieu naturel 3, qui contient 1 % de Yeast Extract Difco, la croissance maxima en aérobiose est proportionnelle à la quantité de sucre, jusqu'à la concentration de 3 %. Dans le même milieu, en absence d'oxygène, la d. o. maxima que l'on peut atteindre est de 7.000 à 9.000.

Tout se passe donc comme si *la croissance en anaérobiose faisait apparaître chez les souches étudiées des nouvelles exigences nutritives*. La nature de ces exigences est pour l'instant inconnue et tout ce que nous pouvons en dire est qu'elles sont vraisemblablement multiples. En effet, l'addition, en plus de la β -alanine et de la biotine, des six vitamines contenues dans le milieu 5 stimule considérablement la multiplication, et le remplacement du milieu synthétique par l'extrait de levure Difco augmente encore plus les valeurs de la croissance maxima.

Il est bien connu depuis PASTEUR (1876) que la présence d'oxy-

(1) Nous utilisons l'expression « rendement réel » pour désigner le rapport entre la matière organique formée et la matière organique utilisée (MONOD, 1942) ; le rendement de croissance, *croissance maxima/concentration initiale en sucre*, représente le rendement réel dans le cas où l'arrêt de la croissance est déterminé par l'épuisement du sucre.

(2) Toutes les valeurs de la croissance maxima des cultures sont obtenues avec des inocula aérobies standard, ayant une d. o. = 4 à 20, c'est-à-dire 2 à 10 mg ps/litre.

gène stimule la prolifération de la levure, et que le rendement réel de la croissance est réduit en anaérobiose. Bien que cette découverte fondamentale soit à l'origine de très nombreuses recherches sur le mécanisme de l'obtention de l'énergie par les êtres vivants (v. discussion sur l'effet Pasteur, § 4.6), nos connaissances sur la croissance anaérobie de la levure, phénomène qui est à la base de l'effet Pasteur, sont relativement restreintes et parfois contradictoires. Dans leur livre classique sur la fermentation, JÖRGENSEN et HANSEN (1948) affirment « que l'on n'a pas trouvé d'espèce de levure capable de se développer en anaérobiose complète ». PASTEUR (1876) constate que « ... la levure semée dans le milieu privé d'oxygène ne se développe qu'autant que cette levure est dans un état de grande jeunesse », par laquelle il entend la multiplication cellulaire très active. Plusieurs observations de A. BROWN (1905) et H. BROWN (1914) tendent à montrer que la levure possède un pouvoir limité de se multiplier en anaérobiose, soit aux dépens des réserves d'oxygène absorbé avant l'ensemencement, soit aux dépens des réserves d'oxygène toujours présentes dans le milieu de culture. Le même point de vue est soutenu par WINDISCH (1932) qui prétend que l'oxygène est indispensable pour la prolifération infinie de la levure. Dans une série de travaux récents, STIER et ses collaborateurs (1947-1950) ont repris l'étude de ce problème. Leurs expériences montrent qu'il est possible d'entretenir indéfiniment la levure dans une atmosphère d'azote qui contient moins de 0,01 % d'oxygène (STIER et coll., 1950). Les modalités de cette multiplication sont cependant très particulières : dans le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose, l'ampleur de la croissance est fonction des conditions d'aération de l'inoculum ; après plusieurs générations cellulaires en absence d'oxygène, il s'établit dans la population un équilibre dynamique qui est déterminé par la nature du milieu et la race de la levure (BROCKMAN et STIER, 1947). Il en résulte qu'une population cellulaire dont l'effectif numérique reste inchangé, continue à fermenter le glucose avec une vitesse constante. Cette constance numérique est due au fait que les milieux que l'on utilise d'habitude sont insuffisants pour la croissance anaérobie de la levure. STIER et SCALF (1949) et STIER et coll. (1950) ont trouvé que certaines huiles extraites du malt et du blé sont des sources de facteurs de croissance anaérobie. Il semble donc hautement probable qu'en plus des facteurs hydrosolubles dont nous avons entrevu le rôle au début de ce paragraphe, la levure requiert pour son développement dans un milieu dépourvu d'oxygène des substances liposolubles.

La majorité de nos cultures anaérobies a été effectuée dans le

milieu 3. La figure 31 permet de comparer la croissance des souches « grande » et « petite » dans ce milieu. Comme on pouvait s'y attendre, 59 R forme en aérobiose plus de matière vivante que 59 RA. La différence est cependant moindre que dans les expériences

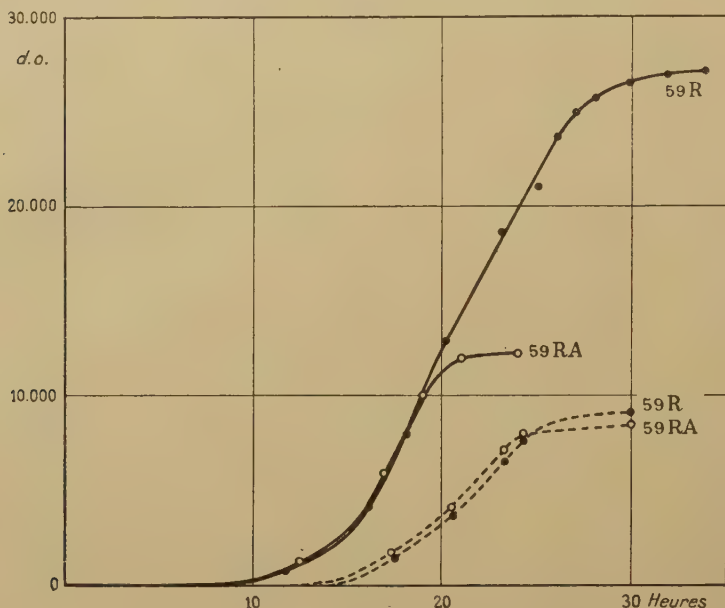


Fig. 31. — Croissance aérobique et anaérobique des souches 59 R et 59 RA.

Trait plein : aérobiose, mode VI, milieu 3 ; trait pointillé : anaérobiose, mode VII, milieu 3.

de TAVLITZKI (1949) où le rapport *croissance maxima de 59 R : croissance maxima de 59 RA* était de 4. Ceci est vraisemblablement dû au fait que l'arrêt de croissance de 59 R dans le milieu 3 contenant 5,4 % de sucre n'est pas causé par l'épuisement complet de ce dernier. D'autre part, les taux de croissance des « petites » et des « grandes » pendant la phase exponentielle sont sensiblement identiques (une génération cellulaire dure 1,8 - 1,9 heures à 26°). On se souviendra que TAVLITZKI (1949), EPHRUSSI et coll. (1949) et PREVOST (inédit) ont observé un taux de croissance supérieur chez les « grandes ». Outre que les auteurs cités ont utilisé des milieux de culture ayant une composition différente, il faut noter qu'ils ont constaté que le taux de croissance des « petites » se rapproche graduellement de celui des « grandes » au cours des repiquages successifs. Etant donné que toutes les expériences dont il est question

ici ont été effectuées avec la souche 59 RA qui a subi au moins 450 passages depuis son isolement, il est possible qu'il s'agisse là du résultat de la sélection d'une race « petite » à taux de croissance plus élevé. Ce changement, intéressant à plusieurs points de vue, n'influence en rien les propriétés fondamentales de la souche 59 RA qui nous intéressent, à savoir le métabolisme glucidique global et la constitution enzymatique des systèmes respiratoires.

Dans ce qui va suivre, nous allons (sauf mention spéciale) entendre par levure cultivée en anaérobiose, des populations cellulaires obtenues dans le milieu 3, mode VII et prélevées au moment où la d. o. a atteint des valeurs comprises entre 3.000 et 5.000, l'ensemencement étant effectuée avec des inocula aérobies standard de d. o. = 4 à 20.

4.3. RÔLE DE L'OXYGÈNE DANS LE COMPORTEMENT DE LA LEVURE NORMALE

4.31. *Métabolisme du glucose ; systèmes enzymatiques de la levure cultivée en anaérobiose*

On se souvient des caractéristiques métaboliques d'une levure normale cultivée en aérobiose (§ 3.2). Lorsqu'une telle levure est placée dans du milieu nutritif à l'abri de l'oxygène, il suffit qu'elle y fasse 6 à 8 générations cellulaires (ce qui correspond à environ 24 heures de culture) pour que ses caractéristiques soient radicalement modifiées. La figure 32 montre la respiration et la fermentation aérobie de glucose de la souche B II cultivée soit en aérobiose, soit en anaérobiose. On y voit que la levure qui a proliféré en présence d'oxygène respire et fermente le sucre avec une vitesse constante ($Q_{O_2} = 74$; Q_{CO_2} ferm. = 93), tandis que la respiration de la culture anaérobie augmente rapidement au cours des mesures manométriques : le Q_{O_2} qui est de 9 pendant la première heure, passe à 41 au cours de la quatrième ⁽¹⁾. La fermentation aérobie du glucose, très intense au début de l'expérience (Q_{CO_2} ferm. = 230) diminue graduellement (Q_{CO_2} ferm. = 125 pour la quatrième

(1) Il est à noter que, pendant les premières 20 ou 30 min. de contact avec le glucose dans les fioles de Warburg, les cultures anaérobies présentent parfois un Q_{O_2} apparemment positif (dégagement au lieu d'absorption). Ce dégagement peut être dû soit à ce que la potasse n'arrive pas à absorber le CO_2 dégagé par la forte fermentation aérobie, soit à la production d'un autre gaz, hydrogène ou méthane, par exemple, qui n'est pas absorbé par le KOH. Si la deuxième hypothèse était exacte, l'emploi de la méthode directe de Warburg sous-estimerait la valeur de la respiration. Etant donnée la faible intensité de ce phénomène ($Q = +1$ à 3) il ne peut influencer que d'une façon négligeable le calcul de l'intensité respiratoire, qui est fait au bout de 60 minutes, et qui, dans le cas de la levure cultivée en aérobiose, correspond à un $Q_{O_2} = -70$ à -80 .

heure) sans atteindre cependant les valeurs caractéristiques de la culture aérobie.

L'examen spectroscopique d'une levure ayant proliféré en anaérobiose révèle des changements profonds dans son système des cytochromes. Les bandes α des cytochromes b et c sont remplacées par

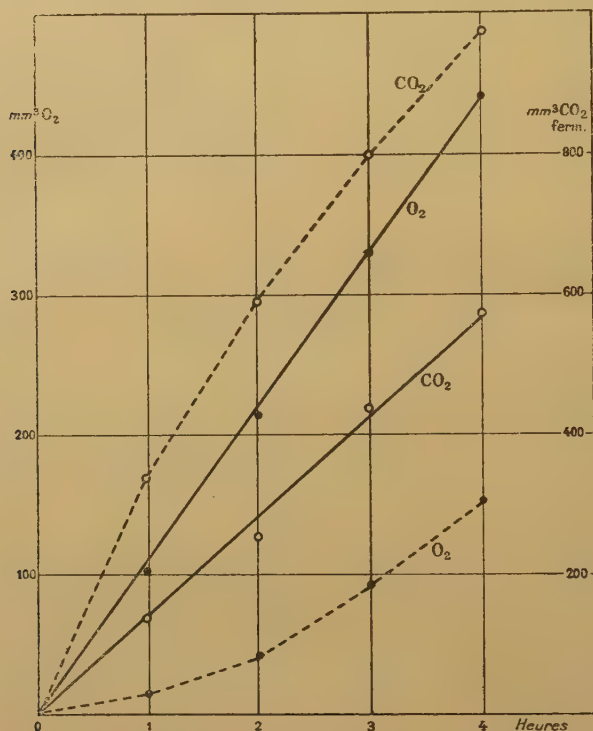


Fig. 32. — Respiration et fermentation aérobie de la souche B II cultivée en aérobie et en anaérobiose.

Par fiole : 1,5 mg ps de levure ; glucose 4 % additionné au temps 0.

Trait plein : culture aérobie de 43 h. ; milieu 1g ; mode I ; trait pointillé : culture anaérobie de 43 h. ; milieu 1g ; mode II.

une large et forte bande occupant une position intermédiaire (centre à 557-559 $m\mu$), tandis que la bande α du cytochrome a est remplacée par une faible et large bande aux environs de 580 $m\mu$ (αa_1). On distingue encore une troisième bande faible à 530 $m\mu$ (fig. 33 AN). La bande à 557-559 $m\mu$, que nous allons provisoirement assimiler à αb_1 , ne résulte pas de la fusion des bandes des cyto-

chromes *b* et *c*, mais correspond bien à un nouveau composé. Dans l'air liquide, elle reste unique et se déplace à 554 m μ . Après chauffage de la levure, l'observation à la température normale ne permet pas de la voir. L'observation à -170° montre l'absence de la bande αc . On voit apparaître à cette température une nouvelle et forte bande thermostable, située à 555-556 m μ , qui n'est pas décelable dans la culture aérobie. Nous discuterons plus loin (§ 4.6) la signification de ces bandes d'absorption.

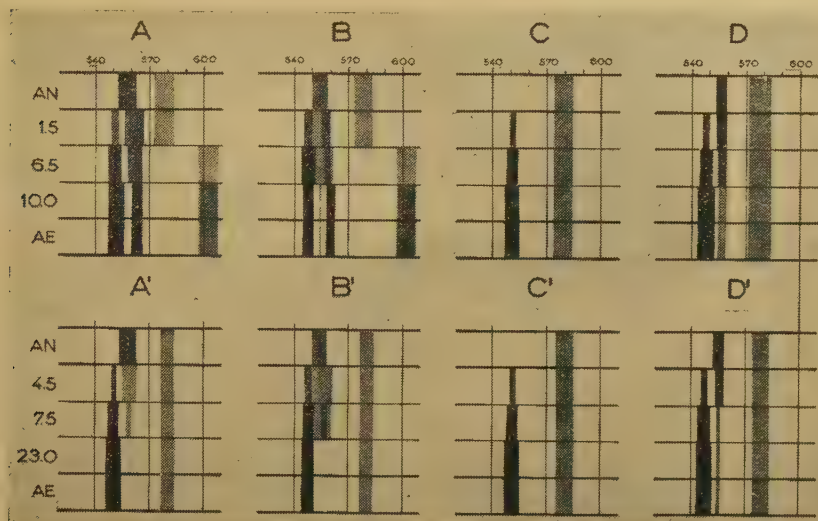


Fig. 33. — Evolution du spectre de la levure cultivée en anaérobiose et aérée dans du tampon glucosé.

A, B, C, D : souche 59 R ; même expérience que celle du tableau XXXVII.

A', B', C', D' : souche 59 RA ; même expérience que celle du tableau XXXIX.

A, A' : spectres observés à 18° ; B, B' : spectres observés à -170° ;

C, C' : spectres de la levure chauffée à 80° pendant 20 min. et observée à 18° ; D, D' : idem, observé à -170° .

Etant donnée la sensibilité de la méthode, ces observations indiquent que la quantité de cytochrome *c* doit être inférieure à 0,03 μ g-atome Fe/g N. Le dosage de l'hémochromogène pyridinique fournit la valeur de 1,4 μ g-atome Fe/g N.

Les cytochromes *a*, *b*, *c*, ne sont pas les seuls constituants du système respiratoire qui disparaissent chez la levure normale ayant proliféré en absence d'O $_2$. Il en est de même pour plusieurs systèmes enzymatiques dont l'activité a été mesurée dans des broyats pré-

parés à partir de cultures anaérobies. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau XXXIII, qui donne en outre, à titre de comparaison, les valeurs obtenues avec les cultures aérobies

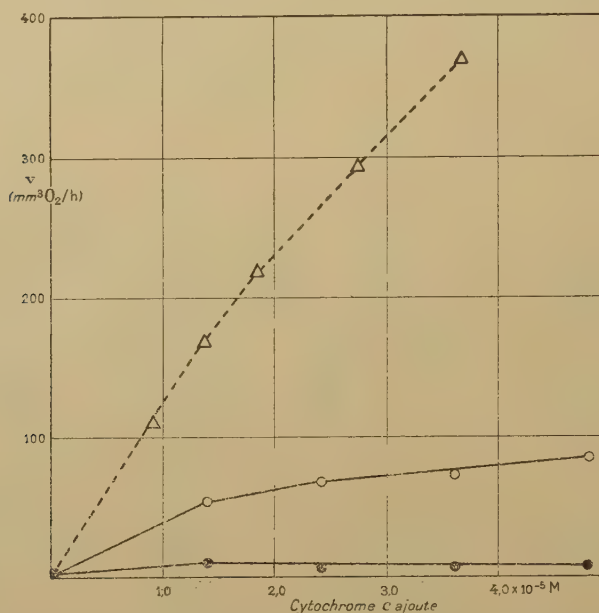


Fig. 34. — Comparaison des activités cytochrome-oxydasiques de la levure 59 R cultivée en aérobiose, en anaérobiose et après adaptation.

Points : $0,3 \text{ cm}^3$ ($= 0,47 \text{ mg N}$) de la fraction G du broyat provenant de la levure anaérobie ; cercles : $0,3 \text{ cm}^3$ ($= 0,3 \text{ mg N}$) de la fraction G du broyat de la même levure aérée pendant 3 h. dans du tampon glucosé ; triangles : $0,3 \text{ cm}^3$ ($= 0,41 \text{ mg N}$) de la fraction G du broyat de la levure aérobie.

Conditions du test, v. légende du tableau XVIII.

(§ 3.3). Les broyats sont préparés et fractionnés selon la technique décrite dans le paragraphe 2.71. Comme on le voit dans le tableau II, l'efficacité de l'extraction des cultures anaérobies est sensiblement la même que celle des cultures aérobies ⁽¹⁾. Les tests d'activité sont

(1) Notons que les broyats des cultures anaérobies (aussi bien que ceux de la souche « petite » qui a poussé en aérobiose) sont plus transparents que les broyats des levures normales cultivées en présence d' O_2 , bien que leurs teneurs en azote soient les mêmes. Il est possible que cette différence d'opacité soit due à la plus faible teneur en polysaccharides ou lipides.

effectués dans les conditions standard (voir §§ 3.342 et 3.35). Nous allons discuter chaque étape de la respiration terminale séparément.

Cytochrome-oxydase. Son activité est diminuée au moins plusieurs centaines de fois. Comme le montre la figure 34, il est même difficile d'affirmer que la très faible oxydation de l'ascorbate que l'on mesure soit due à l'action de la cytochrome-oxydase plutôt qu'à celle d'une oxydase non spécifique, car l'addition de quantités croissantes de cytochrome *c* n'a apparemment aucun effet sur la vitesse d'absorption d'oxygène. Cette absence de stimulation peut être due soit au fait que la quantité de cytochrome-oxydase est extrêmement faible et que l'enzyme est saturé par de très faibles quantités de cytochrome *c*, soit à ce que l'oxydation ne fait pas intervenir la cytochrome-oxydase vraie. Il est intéressant de noter que les broyats de « grandes » cultivées en anaérobiose se comportent différemment de ceux des « petites » ayant proliféré en aérobiose, car dans le dernier cas les valeurs de *V* (vitesse d'oxydation nette) sont légèrement négatives (cf. § 3.3427). On peut expliquer ce fait en admettant que, chez le mutant, l'absence d'activité est due à la perte totale de l'enzyme et que c'est la quantité d'enzyme qui est très notablement réduite lorsqu'on fait proliférer une « grande » en absence d'oxygène.

Déshydrogénase lactique. La diminution de cet enzyme est aussi marquée (200 à 1.000 fois) que celle de la cytochrome-oxydase, et ceci est vrai quel que soit l'accepteur d'hydrogène (BM ou cytochrome *c*). A la lumière des travaux de BACH et coll. (1946), il est vraisemblable que les levures cultivées en anaérobiose sont dépourvues de cytochrome *b*₂.

*Déshydrogénase succinique et Co I H₂-cytochrome *c*-réductase.* Ces deux systèmes enzymatiques également sont très peu actifs chez la levure anaérobie, mais leur diminution (20-150 fois) n'est cependant pas aussi marquée que celle des enzymes étudiés plus haut. Le succinate et le Co I réduit sont d'autre part capables de réduire quantitativement le cytochrome *c* ajouté au broyat de levures anaérobies, tandis que le lactate ne l'est pas. Il est donc évident que la diminution de la teneur en Co I H₂-cytochrome *c*-réductase et en déshydrogénase succinique au cours de la croissance anaérobie accuse un certain retard par rapport à la disparition de la cytochrome-oxydase et de la déshydrogénase lactique.

Déshydrogénase malique. La diminution de ce système, bien que toujours significative, est beaucoup plus faible que celle des enzymes discutés plus haut (4-6 fois seulement). L'activité, à la suite de la multiplication anaérobie, est du même ordre de grandeur que celle

TABLEAU XXXIII

Activité des différents enzymes respiratoires des broyats de cultures aérobies et anaérobies de la souche 59 R.

Activité enzymatique	Culture en aérobiose			Culture en anaérobiose				Diminution %
	Q _a ^d	Q _a ^d (N)	R _a ^d (N)	Expérience	Q _a ^d	Q _a ^d (N)	R _a ^d (N)	Ran - Rae
								Rae
Cytochrome c → O ₂	5.000	6.400	677	D 8	env. 30	env. 20	env. 2	> 99
Lactate → cyt. c	682	390	214	D 7 D 8	5 1,3	1,8 0,4	1,0 0,2	> 99
Lactate → BM	273	152	69	D 4 D 7 D 8	3,2 < 5 < 0,6	1,5 < 1,8 < 0,2	0,8 < 1,0 < 0,1	99
Succinate → cyt. c	220	121	68	D 7 D 8	16 3	5,9 1	3,4 0,6	96
Succinate → BM	39	22	10	D 4 D 8	< 1 < 0,5	< 0,5 < 0,2	< 0,3 < 0,1	> 97
α-glycéro-phosphate → cyt. c	257	146	80	D 7 D 8	4,0 1,0	1,4 0,3	0,8 0,2	> 99
CoI H ₂ → cyt. c	1.475	802	492	D 7 D 8	92 20	33 6,9	19 3,4	98
Malate → CoI → BM	1.290	713	339	D 4 D 8	328 288	154 99	82 49	80
Alcool → CoI → BM	414	215	101	D 4 D 8	1.170 1.440	550 496	294 246	Stimulation 168

Les différentes mesures effectuées dans les conditions décrites dans les tableaux XVIII, XX, XXII, XXIII, XXIV, XXVI, XXVIII, XXX.

trouvée dans les broyats de la souche 59 RA qui a proliféré en présence d'oxygène. Parallèlement à la réduction de l'activité, on trouve (comme chez le mutant cultivé en aérobiose) que l'optimum du pH de la réduction du BM est déplacé vers 8,3 au lieu d'être à 8,9-9,0 (cf. § 3.354).

Alcool-déshydrogénase. Non seulement elle ne diminue pas au cours de la croissance anaérobie, mais sa teneur *augmente* 2 à 3 fois et l'optimum du pH de la réduction du BM se déplace vers l'alcalinité (8,3-8,4 au lieu de 7,7 pour les cultures en aérobiose (cf.

§ 3.355). La situation est donc tout à fait identique à celle du mutant qui a proliféré en présence d'oxygène, et confirme une fois de plus la justesse de l'interprétation selon laquelle la vitesse de réduction du BM par le malate et l'alcool par l'intermédiaire du Co I, est limitée par la quantité de déshydrogénases proprement dites, et non par la diaphorase.

Il est évident qu'avant de conclure que les différences entre les activités des broyats dialysés des jeunes aérobies et anaérobies sont dues à des différences dans la *teneur en enzymes*, il fallait satisfaire les divers desiderata qui ont été discutés en détail lors de l'étude du mutant « petite colonie » (égalité de l'extraction, égalité de stabilité, et absence d'interaction entre les broyats des cultures aérobies et anaérobies). Nous l'avons fait d'une part en mesurant l'activité des mélanges des broyats AN et AE et, d'autre part, en extrayant un mélange connu de cultures aérobies et anaérobies. Les résultats de ces expériences ont montré que les différences de l'activité sont dues à la différence dans la quantité d'enzyme.

La comparaison des expériences D7 et D8 (tableau XXXIII) permet de constater en outre que, comme dans le cas de la respiration des cellules intactes, la disparition des déshydrogénases est d'autant plus grande que la croissance en anaérobiose est plus prolongée : la culture D7, qui a proliféré en anaérobiose pendant neuf générations, contient plus d'enzymes respiratoires que la culture D8, qui a fait 11 divisions en absence d'O₂.

Des modifications analogues à celles observées à la suite de la croissance sans O₂, peuvent-elles être induites par l'anaérobiose en absence de multiplication cellulaire ? L'expérience suivante permet de répondre à cette question. Une levure qui a proliféré en aérobiose est placée dans deux colonnes, dont l'une contient simplement du tampon et l'autre du tampon glucosé à 5,4 %. L'anaérobiose est assurée par passage d'azote purifié. De temps en temps des échantillons sont prélevés et soumis aux examens spectroscopiques et aux tests d'activité. L'observation spectroscopique ne permet de déceler aucun changement, même au bout de 22 heures, temps suffisant pour changer complètement le spectre des cellules proliférantes. Les résultats des autres mesures sont donnés par le tableau XXXIV qui permet de constater que la capacité respiratoire et les teneurs en cytochrome *c* et en protohèmes restent sensiblement constantes, et que seule la fermentation aérobie diminue graduellement pour tomber, au bout de 22 heures, à environ 50 % de la valeur initiale.

TABLEAU XXXIV

Evolution, en absence d'oxygène, de la levure 59 R ayant proliféré en aérobiose.
(Pour les détails, v. § 4.31.)

	Heures	Poids sec (mg 10^{-8})	N (mg 10^{-9})	Q_{O_2}	Q_{CO_2} fermen- tation	Cyto- chrome c (mg Fe 10^{-14})	Proto- hème
Tampon + Glucose	0	0,84	0,88	$4,0 \times 10^{-7}$	16×10^{-7}	4,6	16
	4,5	1,0	0,75	3,7	9,7	4,8	—
	13	1,0	0,61	3,9	6,5	3,9	12
	22	1,3	0,60	4,3	5,9	3,9	14
Tampon	22	0,90	0,92	3,7	17	4,5	—

Toutes les valeurs sont calculées par cellule de levure. Les coefficients manométriques expriment le nombre de mm³ de gaz absorbé ou dégagé pendant les premières 60 minutes de contact avec le glucose à 4 %.

Le tableau XXXIV permet de constater également qu'au cours de l'expérience, le nombre de cellules s'accroît légèrement, tandis qu'il reste stationnaire dans le témoin (tampon seul). Cette multiplication a pour effet une diminution de l'azote par cellule, diminution qui est peut-être responsable de celle de l'intensité fermentaire (cf. DE LEY, 1949). Le poids sec d'une cellule individuelle augmente progressivement : de $0,837 \times 10^{-8}$ mg, il passe à $1,25 \times 10^{-8}$ mg. Cette augmentation peut être attribuée à l'accumulation des réserves endogènes, non utilisables en anaérobiose (cf. § 3.23).

Comme nous venons de le voir, la levure qui a proliféré pendant un temps relativement court en anaérobiose, perd temporairement le pouvoir d'oxyder le sucre, mais conserve le pouvoir fermentaire. L'amplitude de cette perte dépend en premier lieu du degré d'anaérobiose et du nombre de générations qui ont eu lieu en absence d'oxygène. Lorsqu'on fait proliférer en *anaérobiose partielle* une levure qui, au départ, possède le système complet des cytochromes, on n'observe pas la transformation totale et on n'aboutit pas à l'image donnée par la figure 33 (AN). L'expérience dont les résultats sont donnés dans le tableau XXXV en témoigne. Deux fioles d'Erlenmeyer de 1 litre et une de 3 litres, contenant chacune 250 cm³ de milieu 3, sontensemencées avec 0,69 mg ps de 59 R. Dans les deux premières, qui sont munies de soupapes à mercure, on fait passer un courant d'azote (300 cm³ à la minute) pendant 5 et 60 minutes respectivement ; on ferme ensuite l'arrivée du gaz et

on place les fioles sur une machine à agiter, dans une étuve à 28°. L'atmosphère de la troisième fiole, qui sert de témoin, est continuellement renouvelée par un courant d'air comprimé stérile et humide. Au bout de 28 heures de croissance, on détermine les caractéristiques métaboliques et les spectres des levures.

TABLEAU XXXV

Comparaison des levures 59 R ayant proliféré en anaérobiose, en semianaérobiose et en aérobiose. (Pour les détails, v. § 4.31.)

Conditions de culture				Caractéristiques cellulaires				
Atmosphère	Croissance			mg ps $\times 10^{-8}$	mg N $\times 10^{-9}$	Q_{O_2}	Q_{CO_2} ferm.	Cyt. c (mg Fe $\times 10^{-14}$)
	d. o. init.	d. o. finale	nb générat.					
Air	5,5	24.600	12,1	0,91	0,77	$8,1 \times 10^{-7}$	$5,2 \times 10^{-7}$	7,3
Azote pt 5 m.	5,5	11.000	11	1,0	1,0	1,8	24	2,1
Azote pt 60 m.	5,5	1.250	7,8	1,5	2,6	0,2	34	< 0,3

Voir légende du Tableau XXXIV.

La levure aérobie a fait 12 divisions cellulaires. Elle présente le spectre et le métabolisme classiques. La culture anaérobie a effectué 8 divisions en 28 heures. Sa respiration est presque complètement abolie. Le remplacement partiel de l'air par l'azote (5 minutes de rinçage) a pour résultat la formation de cellules qui sont, à tous les égards (croissance, respiration, fermentation, teneur en cytochrome c, poids des cellules et leur teneur en azote), intermédiaires entre les deux extrêmes. L'étude du spectre est particulièrement instructive. A la température du laboratoire, on observe une large et forte bande à 556-557 m μ . Cette bande semble être identique à celle de la levure ayant proliféré en anaérobiose totale, mais elle se scinde à — 170°, ce qui fait apparaître la bande α thermostable du cytochrome c, et une forte bande à 558-559 m μ qui est vraisemblablement composée des bandes α des cytochromes b et b₁.

La levure proliférante présente le même état intermédiaire si elle est examinée *peu de temps* (2-3 générations cellulaires) *après l'établissement de l'anaérobiose totale*.

Plusieurs expériences ont été réalisées pour montrer que c'est réellement le manque d'oxygène qui est responsable de la perte des enzymes respiratoires en anaérobiose.

Influence du CO₂. A la fin de la croissance anaérobie, la phase

gazeuse de nos dispositifs de culture est constituée presque uniquement par du CO_2 et on pouvait penser que ce gaz a une influence inhibitrice sur la formation des enzymes respiratoires. L'expérience suivante montre que ceci n'est pas le cas. Deux fioles de 1 litre sont soudées aux extrémités d'un large tube. Dans l'une on place la culture ; l'autre contient une quantité de KOH concentrée dix fois supérieure à la quantité de CO_2 qui peut, théoriquement, être dégagée. L'anaérobiose est réalisée de la façon habituelle, les fioles sont bouchées hermétiquement et agitées à l'étuve. La respiration et le spectre de la levure qui se développe dans ces conditions sont identiques à ceux de la levure qui a proliféré en présence de CO_2 .

Nature du milieu de culture. On se souvient qu'en anaérobiose les besoins nutritifs de la levure sont plus grands, et différents de ceux de la levure en aérobie (§ 4.2). Il était donc concevable que l'absence de synthèse des enzymes respiratoires au cours de la prolifération anaérobie ne soit qu'une conséquence indirecte de l'absence d'oxygène et soit due en réalité à l'absence dans le milieu de culture d'un facteur de croissance inconnu. On connaît, en effet, de nombreux exemples où la biosynthèse d'un enzyme dépend de la présence dans le milieu de facteurs spécifiques qui sont des « Bausteine » de la molécule enzymatique (cf. LWOFF, 1943). Nous nous sommes donc demandé si la composition des milieux de culture n'influait pas le phénomène de la perte des enzymes respiratoires en anaérobiose. Des expériences réalisées avec des milieux naturels 1, 3, et le milieu synthétique 5, liquides ou solides, ont montré que le phénomène n'est pas dû à des exigences nutritives. En effet, une levure dans le milieu naturel 3, examinée au moment de sa multiplication active, présente sensiblement le même spectre qu'une levure en milieu synthétique 5 dont la prolifération est arrêtée depuis plusieurs heures à la suite de la carence en facteurs de croissance contenus dans l'extrait de levure Difco. Dans tous ces milieux, et en anaérobiose, le cytochrome *c* et la respiration disparaissent après quelques générations cellulaires.

Influence du pH. On pouvait penser que la perte des enzymes était due à l'acidité plus grande des cultures anaérobies. Or, les mesures du pH au cours de l'évolution de nos cultures en aérobie et en anaérobiose montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre le pH du milieu et la constitution des cytochromes de la levure. En anaérobiose, la disparition des bandes normales se produit, selon le milieu et les conditions d'ensemencement, à des pH variés. La synthèse des cytochromes en aérobie peut se produire à ces mêmes pH.

Age physiologique de la culture. En anaérobiose complète, l'état extrême caractéristique peut être atteint, selon l'importance de l'inoculum, au cours de la phase de croissance active, aussi bien que pendant la phase de ralentissement et après l'arrêt de croissance. D'autre part, une culture anaérobie qui a atteint, pendant la phase active de la multiplication, le type métabolique caractérisé par la perte de la respiration et des constituants normaux du système WARBURG-KEILIN, conserve ces propriétés au delà de l'arrêt de croissance. Le tableau XXXVI permet de voir qu'une culture, dont la croissance est arrêtée depuis 20 heures environ, ne se distingue d'une culture en pleine multiplication que par une fermentation plus faible. La signification de cette diminution du pouvoir fermentaire sera discutée plus loin (§ 4.41).

TABLEAU XXXVI

Indépendance de la perte des enzymes respiratoires vis-à-vis de la phase de croissance anaérobie. (Pour les détails, v. § 4.31.)

Croissance			Caractéristiques cellulaires				
Phase	d. o.	Durée	mg N	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ferm.	Cyt. c (mg Fe × 10 ⁻⁶)	Protohème
Active	3.010	23,5 heures	0,12	1	300	< 0,3	10
Stationnaire	7.040	50 heures	0,13	0	148	< 0,3	9,2

Voir légende du Tableau XXXIV. Les valeurs sont calculées ici par mg ps.
Levure 59 R.

4.32. Effet de l'oxygène sur la levure ayant proliféré en anaérobiose

On a vu dans le paragraphe précédent les changements, provoqués par la croissance en absence d'oxygène, dans la constitution d'une levure qui avait au départ l'arsenal complet d'enzymes respiratoires. On se souvient, d'autre part, que ces changements requièrent une multiplication cellulaire active : en effet, en absence de prolifération, la capacité respiratoire et la quantité de cytochrome *c* restent sensiblement constantes. Nous allons étudier maintenant le processus inverse, c'est-à-dire l'influence exercée par l'oxygène sur une levure ayant proliféré en anaérobiose. Cette étude nous montrera si les changements subis par la population cellulaire au cours de la culture anaérobie sont réversibles et purement phénotypiques, ou s'ils comportent au contraire des changements génotypiques.

Quand on étale une suspension diluée de levure cultivée en anaérobiose sur le milieu 1g en boîtes de Petri, les colonies qui se développent en présence d'oxygène sont toutes pareilles et présentent le spectre classique (exception faite, bien entendu, des quelques pourcents de colonies « petites spontanées » dont la proportion est du même ordre de grandeur que dans le cas où l'inoculum est fait avec une suspension de levure aérobie). Il est donc évident qu'une croissance en anaérobiose, de courte durée, n'induit pas dans la population cellulaire d'hétérogénéité génétique décelable par la taille des colonies et que la perte des enzymes respiratoires n'est pas héréditaire.

Dans les expériences dont nous donnerons maintenant les résultats, une levure qui a proliféré en anaérobiose est placée dans une colonne à aération dans du tampon glucosé, c'est-à-dire dans un milieu qui ne permet pas la croissance ⁽¹⁾. Les changements qu'elle subit dans ces conditions sont le mieux illustrés par les modifications du spectre. On les suivra facilement sur la figure 33 dont la première ligne horizontale représente le spectre de la levure au départ. Les lignes horizontales suivantes décrivent l'évolution du spectre avec le temps.

Déjà au bout d'une heure et demie, on constate l'apparition du cytochrome *c*, dont la quantité s'accroît progressivement. Les cytochromes *b*₁ et *a*₁ disparaissent au fur et à mesure que les cytochromes *c*, *b* et *a* sont formés. La bande thermostable située à 555 mμ, très forte au début, s'estompe progressivement pour disparaître presque complètement à la fin de l'expérience. Après 10 heures d'aération, la levure possède le même spectre que la levure cultivée en aérobie (ligne AE de la figure 33).

Les résultats des diverses mesures effectuées sur des échantillons de cette levure sont donnés par le tableau XXXVII. On y voit l'accroissement rapide de la teneur en cytochrome *c* et l'augmentation parallèle de la capacité respiratoire. Les protohèmes totales augmentent rapidement au cours des deux premières heures ; leur augmentation ultérieure ne dépasse pas les limites des erreurs d'expé-

(1) Pour soumettre la levure non-proliférante à diverses conditions d'aération, nous opérons de la façon suivante. La culture est recueillie dans des tubes à centrifuger et est lavée 3 fois par centrifugation à 0° dans du tampon phosphate M/15 à pH = 4,6. Le culot est resuspendu dans le même tampon additionné ou non de glucose. La suspension est placée dans des colonnes en Pyrex (8 cm × 80 cm) dont le fond est constitué par un filtre en verre poreux. Le tube de ce filtre permet l'injection de gaz, dont le passage assure en même temps le brassage de la suspension. Les colonnes sont placées dans une étuve à 28° C. On utilise comme antimousse quelques cm³ d'huile additionnée de 5 % d'acide oléique.

rience. La fermentation aérobie diminue graduellement pour tomber au bout de 10 heures à environ 20 % de la valeur initiale.

TABLEAU XXXVII

Evolution, en présence d'oxygène, de la levure 59 R ayant proliféré en anaérobiose.
(Pour les détails, v. § 4.32.)

	Heures	Poids sec (mg $\times 10^{-8}$)	N (mg $\times 10^{-6}$)	Q_{O_2}	Q_{CO_2} fermen- tation	Cyto- chrome c (mg Fe $\times 10^{-14}$)	Proto- hème
Tampon + tampon	0	1,0	1,2	$0,1 \times 10^{-7}$	31×10^{-7}	< 0,3	9,4
	1,5	1,1	1,1	2,3	27	4,2	19
	3	1,1	0,95	3,5	18	6,5	20
	6,5	1,1	0,91	5,3	9,4	7,5	16
	10	1,0	0,70	4,2	4,9	8,3	16
Tampon	11	1,0	1,2	2,7	22	7,0	13

Voir légende du Tableau XXXIV.

Au cours de l'expérience, le nombre de cellules augmente légèrement, de façon linéaire et a pour effet une diminution de la teneur des cellules en protéines. On constate, au bout de 10 heures, qu'à peu près la moitié des cellules s'est divisée une fois. L'accroissement du rapport *poids sec/azote* est parallèle à cette croissance résiduelle, d'où il résulte que chaque cellule pèse autant qu'au début de l'expérience. Ceci était à prévoir puisque les réserves endogènes peuvent être métabolisées par respiration (cf. § 3.23).

La suspension aérée pendant 11 heures dans le tampon, sans source d'énergie exogène, évolue aussi, mais plus lentement. Il n'y a pas de division cellulaire, ni de changement du rapport *poids sec/azote*. La respiration, la fermentation, la teneur en hémoprotéines et l'image spectroscopique ressemblent à celles qu'on obtient déjà au bout de 2 à 3 heures d'aération en présence de glucose.

La levure témoin, suspendue dans du tampon glucosé et traitée essentiellement de la même façon, mais en anaérobiose ⁽¹⁾, n'évolue pas. Son spectre et sa respiration restent sensiblement les mêmes que ceux de la levure au départ.

L'activité des différents systèmes enzymatiques au cours de l'évolution induite par l'oxygène a été mesurée dans une expérience

⁽¹⁾ La suspension cellulaire est introduite dans des tubes de Thunberg qu'on évacue et remplit d'azote 3 fois. Les tubes sont ensuite agités à l'étuve à 28°.

effectuée dans des conditions analogues à l'expérience précédemment décrite. Les résultats sont donnés par le tableau XXXVIII. Les échantillons étant broyés de la façon habituelle, l'activité des broyats dialysés est mesurée *in vitro* dans des systèmes reconstitués. On voit que, pendant l'aération, la quantité d'enzymes respiratoires s'accroît progressivement et que cette augmentation peut atteindre, dans certains cas, plusieurs centaines de fois la valeur initiale. L'activité de la *cytochrome-oxydase* extraite de la levure aérée pendant 3 heures est stimulé par le cytochrome *c* ajouté (fig. 34). Cependant, cette stimulation n'a pas la même allure que dans le cas de la cytochrome-oxydase de la levure cultivée en aérobiose. On note en effet que l'oxydation de l'ascorbate par le broyat de la levure aérée dans le tampon glucosé est accélérée relativement peu par des quantités de cytochrome *c* qui stimulent considérablement l'activité de l'enzyme de la levure qui a proliféré en aérobiose. Les deux broyats diffèrent surtout par la quantité de cytochrome-oxydase et il est logique, à première vue, d'attribuer le phénomène observé à cette différence. On se souvient cependant que l'activité cytochrome-oxydasique de la fraction G de la levure cultivée en aérobiose semble être proportionnelle à la dilution, quelles que soient les concentrations du cytochrome *c* (§ 3.3426, tableau XVII). Il est donc possible qu'il s'agisse ici d'un changement d'affinité entre l'enzyme et son donateur d'électrons (cytochrome *c*) au cours de leur synthèse. On aurait dans ce cas la situation suivante: l'enzyme extrait des cellules qui n'en contiennent qu'une petite quantité serait plus « efficace » aux faibles concentrations de cytochrome *c*, puisqu'il aurait plus d'affinité que celui qui est extrait des cellules qui en contiennent beaucoup. Etant donné que le cytochrome *c* augmente parallèlement à la cytochrome-oxydase, une telle situation aurait pour effet que l'activité globale d'une certaine concentration du système entier serait plus grande dans le cas de la levure qui est en train de s'adapter que l'activité de la même concentration du système provenant de cellules ayant proliféré en présence d'air. Cet intéressant problème mériterait une étude spéciale qui consisterait à comparer les activités au cours des étapes successives de la synthèse de la cytochrome-oxydase, en utilisant des préparations plus purifiées. Un cas d'adaptation fonctionnelle des hémoprotéines est connu: l'hémoglobine du fœtus des mammifères, qui vit sous des pressions d'O₂ plus basses que celles de la mère, a une plus grande affinité pour l'oxygène que celle de l'adulte. L'hémoglobine fœtale peut fonctionner à des pressions d'O₂ voisines de celles de l'hémoglobine du muscle. Une adaptation phylogénétique a été également

observée pour les hémoglobines des mammifères qui vivent aux hautes altitudes (cf. NEEDHAM, 1942 ; BARCROFT, 1934).

Le système oxydant le *lactate* est synthétisé, sous l'action de l'oxygène, au moins aussi rapidement que la cytochrome-oxydase.

TABLEAU XXXVIII

Activités des différents enzymes respiratoires des broyats de la levure 59 R cultivée en anaérobiose et aérée dans du tampon glucosé.

(Pour les détails, v. § 4.32.)

Activité enzymatique	Temps d'aération								
	0 heures			3 heures			23 heures		
	Q_a^d	Q_a^d (N)	R_a^d (N)	Q_a^d	Q_a^d (N)	R_a^d (N)	Q_a^d	Q_a^d (N)	R_a^d (N)
Cytochrome c $\rightarrow$ O ²	env. 30	env. 20	env. 2	424	412	46	—	—	—
Lactate $\rightarrow$ cyt. c	1,3	0,4	0,2	54	27	15,6	291	123	75
Lactate $\rightarrow$ BM	< 0,6	< 0,2	< 0,1	14	7	4,0	79	33,4	20,4
Succinate $\rightarrow$ cyt. c	3	1	0,6	26	13	7,5	84	35,6	21,6
CoI H ₂ $\rightarrow$ cyt. c	20	6,9	3,4	111	55	32	536	228	138
Succinate $\rightarrow$ BM	< 0,5	< 0,2	< 0,1	—	—	—	—	—	—
α -glycéro-phosphate $\rightarrow$ cyt. c	1,0	0,3	0,2	—	—	—	13	5,5	3,3
Malate $\rightarrow$ CoI $\rightarrow$ BM	288	99	49	560	279	161	—	—	—
Alcool $\rightarrow$ CoI $\rightarrow$ BM	1.440	496	246	418	208	120	—	—	—
Q_{O_2} des cellules intactes	1,8			—			50		
Q_{CO_2} fermentation des cellules intactes	321			—			53		

Voir légende du Tableau XXXIII.

L'augmentation de sa teneur est de 60 et de 300 fois au bout de 3 et 23 heures d'aération, respectivement. Les enzymes oxydant le *succinate* et la *CoI H₂-cytochrome c-réductase* augmentent aussi, mais leur formation est plus lente ; au bout de 3 heures, on en trouve seulement 10 à 12 fois plus, et, après 23 heures d'aération, leur accroissement est de 40 fois. L'augmentation la moins forte concerne

la déshydrogénase *malique* (3 fois au bout de 3 heures d'aération), tandis que la quantité d'*alcool-déshydrogénase* diminue pendant l'aération.

Nous avons aussi étudié quelques autres facteurs conditionnant la synthèse des enzymes respiratoires induite par l'oxygène chez la levure ayant proliféré en anaérobiose.

On a déjà vu que, bien que sa présence ne soit pas indispensable, le glucose stimule cette synthèse.

Les résultats de l'expérience sur l'influence du pH sont représentés par la figure 35. Une suspension de 59 R cultivée en anaérobiose et qui avait au départ un $Q_{O_2} = 2$ et un Q_{CO_2} fermentation $= 340$, a été aérée dans des tampons phosphate glucosés pendant 8 heures à 28° . Les pH des divers tampons (0,1 M) étaient : 4,6 ; 6,0 ; 7,3 ; 8,0 et 8,6 au début de l'expérience ; à la fin de l'expérience ils sont tombés à : 4,1 ; 5,4 ; 6,8 ; 7,1 et 7,4 respectivement. On a séparé la levure et, après les lavages habituels avec du tampon à pH 4,6, on a mesuré, à ce pH, la respiration et la fermentation en présence de glucose. On voit que la synthèse des enzymes respiratoires présente un optimum bien marqué entre pH 6,0 et 6,8. Il est intéressant de noter que l'activité *in vitro* de la cytochrome-oxydase de la levure, comme l'a montré l'expérience décrite dans le paragraphe 3.3422, présente un optimum assez semblable. Etant donné que la cytochrome-oxydase catalyse la réaction « terminale » de la respiration cellulaire et que sa présence détermine le fonctionnement de la chaîne entière, cette coïncidence n'est peut-être pas fortuite. Il est à noter, d'autre part, que le pH intracellulaire de la levure est aux environs de 6 (CONWAY et DOWNEY, 1950). La fermentation aérobie dépend beaucoup moins du pH au cours de l'aération et est légèrement plus intense du côté alcalin. Son intensité globale semble en tous cas être indépendante de l'amplitude de la synthèse des enzymes respiratoires. Ce fait montre, une fois de plus, que la relation entre la fermentation aérobie et la respiration n'est pas aussi simple qu'on le suppose généralement et qu'il est nécessaire de tenir compte de la formation des enzymes (voir § 4.6).

Toutes les expériences sur l'induction de la synthèse des enzymes respiratoires en absence de multiplication cellulaire, décrites jusqu'ici, avaient pour point de départ des populations dans le même état physiologique. Prélevées au moment où la croissance anaérobie dans le milieu 3 atteignait une d.o. $= 3.000$ à 5.000 , ces populations se trouvaient alors en pleine multiplication. On se souvient que, si l'on prolonge la culture en absence d' O_2 au delà de l'arrêt de crois-

4.4. RÔLE DE L'OXYGÈNE DANS LE COMPORTEMENT DU MUTANT « PETITE COLONIE »

On se souvient que les mutants cultivés en aérobiose se distinguent de la levure normale surtout par l'absence de respiration sensible au cyanure et par le fait qu'ils ne contiennent que les cytochromes *c* et *a*₁ (voir Chapitre III). Après 24 heures de croissance en anaérobiose, les différences entre les deux races disparaissent. En effet, une culture de 59 RA qui a proliféré en absence d'O₂, présente à l'état réduit le même spectre d'absorption que la souche 59 R cultivée dans les mêmes conditions (fig. 33). On y distingue, à la température du laboratoire, les bandes α et β du cytochrome *b*₁ à 557-559 et 530 m μ , respectivement et la large bande α du cytochrome *a*₁ à environ 580 m μ . Dans l'air liquide, la bande α *b*₁ reste unique et se déplace à 554 m μ ; l'examen de cette levure après chauffage (80° pendant 20 min.) montre l'absence du cytochrome *c* et la présence d'une forte bande thermostable, visible seulement à -170° et occupant une position intermédiaire entre les bandes α *c* et α *b*. Cette bande se comporte de façon tout à fait identique à la bande à 555-556 m μ (-170°) de la souche normale. Nous allons donc les assimiler, bien que chez le mutant elle occupe une position très légèrement différente (554 m μ à -170°). Le dosage de l'hémochromogène pyridinique fournit la valeur de 0,8 μ g-atome Fe/g N.

Mise en présence d'oxygène dans le tampon glucosé, la levure 59 RA anaérobie se transforme progressivement en levure aérobie, c'est-à-dire acquiert les caractéristiques d'une levure « petite » ayant proliféré en aérobiose. Les termes de passage sont caractérisés par l'effacement progressif de la bande α *b*₁ et de la bande thermostable à 554 m μ , au fur et à mesure que la teneur en cytochrome *c* augmente. Après 23 heures d'aération, le spectre de la levure anaérobie devient identique à celui de la culture aérobie.

Les résultats des dosages et des mesures manométriques sont donnés par le tableau XXXIX. On voit qu'en présence de glucose il y a une très légère multiplication cellulaire qui conduit à l'appauvrissement des cellules en azote. Contrairement à ce qui se passe chez la souche normale, le poids sec d'une cellule augmente considérablement. La respiration reste nulle, mais on assiste à la synthèse du cytochrome *c* qui est cependant plus lente que chez 59 R. La quantité de protohème n'augmente pas ou n'augmente que très peu au cours de 23 heures d'aération. Les variations du pouvoir fermentaire sont difficiles à interpréter parce qu'elles dépendent du mode du calcul de l'intensité métabolique : si on prend comme base de com-

paraison le poids sec, on observe une légère augmentation du Q_{CO_2} , suivie d'une baisse de 40 % environ ; en se fondant sur le Q_{CO_2} (cellule), on constate un accroissement considérable à la quatrième heure, auquel succède un retour à la valeur initiale ; enfin, en calculant par rapport à l'azote cellulaire, on voit que l'intensité fermentaire augmente progressivement au cours de l'aération ⁽¹⁾. Quoi qu'il en soit, nous pouvons conclure que la fermentation aérobie de 59 RA ne change que peu et plutôt dans le sens positif, tandis que dans l'expérience analogue avec 59 R, la fermentation aérobie diminue beaucoup (75-85 % au bout de 10 h.) quelle que soit la base de référence utilisée dans le calcul.

La comparaison de l'évolution des levures normale et mutante en présence de glucose montre une profonde différence : chez la dernière, la disparition du cytochrome b_1 et de la bande thermostable centrée à 554 m μ (— 170°) n'est pas accompagnée de l'apparition du cytochrome b , et le cytochrome a_1 n'est pas remplacé par le cytochrome a . La capacité respiratoire n'est pas rétablie et l'augmentation de la teneur en protohème est négligeable par rapport à celle observée chez 59 R. D'autres différences entre les souches normale et « petite » sont révélées par l'étude de leur évolution dans le tampon non glucosé.

TABLEAU XXXIX

Evolution, en présence d'oxygène, de la levure 59 RA ayant proliféré en anaérobiose.

	Heures	Poids sec (mg $\times 10^{-8}$)	N (mg $\times 10^{-9}$)	Q_{O_2}	Q_{CO_2} fermentation	Cyto- chrome c (mg Fe $\times 10^{-14}$)	Proto- hème
Tampon + Glucose	0	1,5	1,8	0	27×10^{-7}	< 0,3	7,3
	1	1,6	1,7	$0,1 \times 10^{-7}$	24	< 0,3	8,9
	4,5	1,8	1,7	0	40	2,3	8,1
	7,5	1,9	1,5	0	38	3,6	7,7
	23	2,2	1,0	0	23	6,4	6,9
Tampon	7,5	1,6	1,9	0	0	< 0,3	5,4
	23	1,9	1,7	0	0,3	< 0,3	1,6

Voir légende du Tableau XXXIV.

(1) Cette expérience montre clairement combien il est parfois dangereux de tirer des conclusions d'un seul quotient métabolique. Les variations du dénominateur, souvent négligées, peuvent avoir une importance considérable.

On se souvient qu'une culture anaérobie de 59 R acquiert pendant l'aération le pouvoir respiratoire et les constituants normaux du système WARBURG-KEILIN, même en absence de glucose (cf. § 4.32). Au cours de cette évolution, sa capacité fermentaire (mesurée par le $Q_{CO_2}^{N_2}$) ne change pas sensiblement ; le cytochrome *c* et le protohème sont synthétisés lentement. Le comportement de la souche « petite » dans les mêmes conditions est diamétralement opposé. Comme l'indique le tableau XXXIX, non seulement il n'y a pas de synthèse du cytochrome *c*, mais il y a au contraire une diminution très marquée des hémènes totales (75 %) accompagnée d'une abolition complète du pouvoir fermentaire. Cette dernière constatation mérite une attention particulière. C'est la première fois que nous rencontrons des variations aussi brusques du métabolisme anaérobie du glucose. Jusqu'à présent nous pouvions modifier selon notre gré le pouvoir respiratoire d'une levure, mais dans les mêmes conditions la capacité fermentaire demeurait constante et les valeurs du $Q_{CO_2}^{N_2}$ ne dépassaient pas les limites 200-350. Or, dans trois expériences indépendantes, dans lesquelles trois cultures anaérobies différentes de 59 RA ont été aérées dans du tampon phosphate pendant 20 heures, les capacités fermentaires sont tombées à 0, à 40 et à 10. Il s'agit là, à notre connaissance, d'un phénomène nouveau, dont l'étude plus détaillée nous permettra d'aborder certains problèmes du déterminisme de la fermentation.

4.41. *Perte du pouvoir fermentaire*

Les dernières lignes du tableau XXXIX décrivent une levure qui est incapable de métaboliser le glucose immédiatement après son addition, ni par voie respiratoire, ni par voie fermentaire (les données manométriques sont calculées partout d'après les mesures effectuées pendant les 60 premières minutes de contact des cellules avec le substrat). Ces cellules ne sont pourtant pas mortes car, si on les étale sur le milieu complet en boîtes de Petri, on trouve à peu près autant de colonies qu'on aensemencé de cellules. Il est donc évident que la perte du pouvoir fermentaire est transitoire. Deux problèmes intimement liés se posent : d'une part, celui des conditions et du mécanisme de la disparition de la capacité fermentaire, et, d'autre part, celui des facteurs qui rétablissent ce pouvoir chez une levure qui l'a perdu.

Nous allons commencer par la première question. L'expérience dont les résultats sont représentés par les figures 36 et 37 permet de comparer des cultures aérobies et anaérobies de 59 RA. Les cel-

lules, récoltées et lavées à froid, sont suspendues dans le tampon phosphate pH 4,6 M/15 non-glucosé et aérées à 28° dans des tubes à barbotage. Les échantillons sont prélevés de temps à autre et, après lavage, servent à mesurer la fermentation anaérobie en présence du glucose à 4 %. Comme on le voit sur la figure 36, les cellules de la *culture aérobie* fermentent le sucre avec une vitesse pratiquement

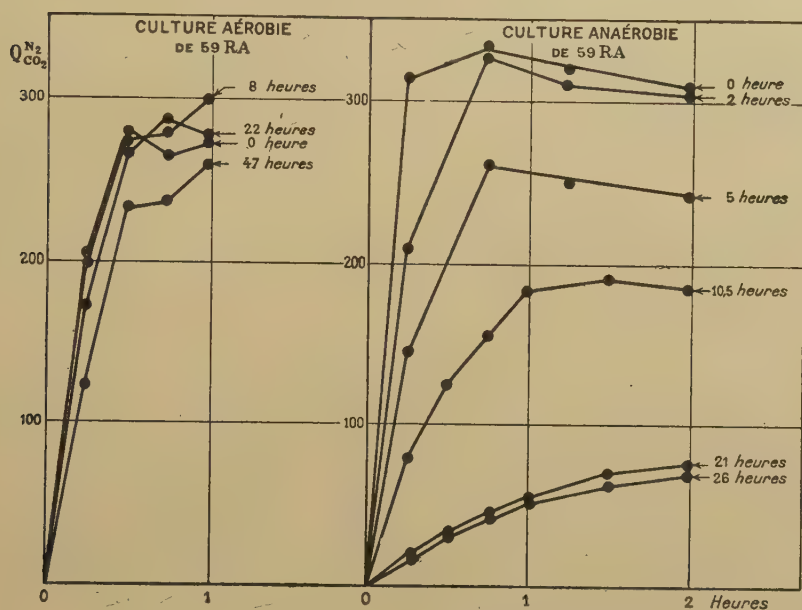


Fig. 36. — *Adaptation à la fermentation du glucose.* (Pour les détails, v. § 4.41.)

Levures cultivées pendant 3 j. dans le milieu 1g, mode I ou II, puis aérées dans le tampon phosphate M/15, pH 4,6. Chaque courbe représente la fermentation anaérobie en présence de glucose à 4 % d'un échantillon prélevé au temps indiqué.

constante à partir de la quinzième minute après l'addition du glucose. Cette vitesse maxima n'est pas influencée par l'aération préalable dans du tampon si celle-ci n'excède pas 24 heures ; elle est diminuée d'environ 10 % après deux jours d'aération. Les résultats obtenus avec une *culture anaérobie* traitée de la même façon sont également représentés par la figure 36. L'évolution du pouvoir fermentaire est tout à fait différente. On y voit qu'au temps 0 la culture anaérobie ne se distingue en rien de la culture aérobie. Le pouvoir fermentaire initial de la culture anaérobie était même, dans cette expérience particulière, légèrement supérieur à celui de la culture

aérobie. Cependant, dès qu'on commence à aérer la culture anaérobie dans le tampon, son pouvoir fermentaire disparaît progressivement, pour tomber à 13 % de son intensité initiale au bout de 21 heures. Cette diminution présente deux traits particuliers : *a)* le temps nécessaire, depuis l'addition du glucose, pour atteindre la vitesse maxima de fermentation, est de plus en plus prolongée (15 minutes pour le prélèvement au temps 0 ; 45 minutes pour celui à 5 h. ; 90 minutes pour celui à 21 h.) ; *b)* la vitesse maxima du dégagement du CO_2 devient de plus en plus petite. Les cellules prélevées au bout de 10 ou 21 heures montrent une véritable adaptation à la fermentation du glucose, puisqu'en présence du substrat la vitesse de son métabolisme (mesurée par le $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$) s'accroît avec le temps, tandis qu'en son absence le pouvoir fermentaire diminue. L'intérêt du phénomène réside dans le fait qu'il s'agit là du glucose, substrat pour lequel l'adaptation n'a jamais été démontrée clairement (KARSTRÖM, 1937).

L'allure des courbes de la figure 36 suggère que l'augmentation du $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ peut être due à la synthèse d'un facteur nécessaire à la fermentation. Cette synthèse, dont la cinétique n'est certainement pas celle d'une réaction autocatalytique, mais ressemble à celle d'une réaction du premier ordre, s'effectuerait en présence du sucre, et son ampleur serait déterminée par la quantité de précurseur présent au moment de l'addition du substrat. La cinétique de la perte du pouvoir fermentaire affecte, elle aussi, l'allure d'une réaction du premier ordre (fig. 37). Il est cependant prématuré d'assimiler ce phénomène à une adaptation enzymatique dans le sens strict du terme (voir § 4.6). Il est, en effet, possible que l'on ait affaire ici, soit à la synthèse d'un facteur de nature non-apoenzymatique, soit à l'élimination progressive des substances qui inhibent la fermentation, soit enfin à l'intervention du glucose en tant que source non spécifique d'énergie.

Quel est le mécanisme de la perte du pouvoir fermentaire dans le tampon ? Les données dont nous disposons sont assez fragmentaires ; il nous paraît néanmoins utile de les discuter. La diminution de la capacité fermentaire n'est pas due exclusivement à l'aération. En effet, dans l'expérience décrite plus haut, un échantillon de la culture anaérobie, repris dans du tampon, a été introduit dans un tube de Thunberg dans lequel on a remplacé l'air par l'azote, et le tube a été agité à 28°. La perte du pouvoir fermentaire a été sensiblement la même que celle observée pour la suspension aérée (fig. 37). Il en résulte que le seul fait de *maintenir pendant quelques*

heures la levure anaérobie dans le tampon phosphate détruit la majeure partie de sa capacité de fermenter le glucose. Ceci n'est vrai que pour certaines températures, car la conservation à froid

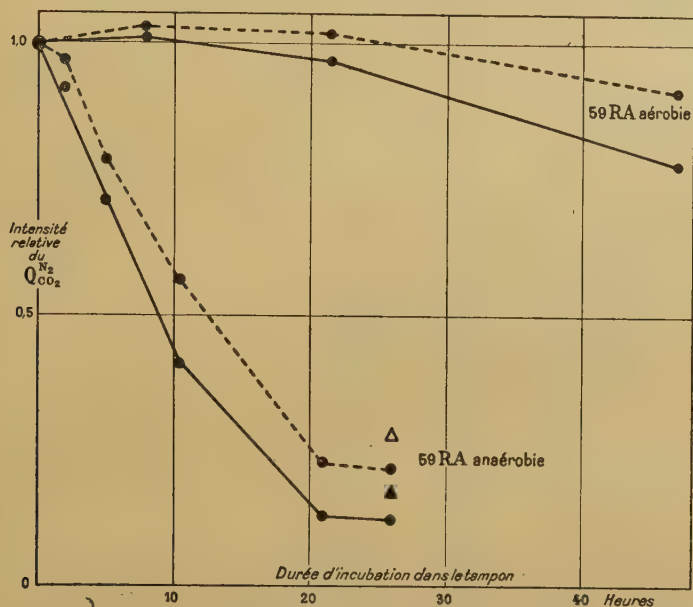


Fig. 37. — Perte du pouvoir fermentaire de cultures aérobies et anaérobies de 59 RA en fonction de la durée d'incubation dans le tampon.

Points : incubation dans le tampon en aérobiose ; triangles : 59 RA anaérobies incubée dans le tampon en anaérobiose ; trait plein : $Q_{CO_2}^{N_2}$ calculé d'après les premières 60 min. de contact avec le glucose à 4 % ; trait pointillé : $Q_{CO_2}^{N_2}$ maximum atteint (v. fig. 36).

(0°) influence à peine les potentialités fermentaires (< 10 % pendant 24 h.).

L'expérience représentée par la figure 38 permet de comparer l'évolution des pouvoirs respiratoire et fermentaire des souches « grande » et « petite ». Examinons d'abord l'évolution de la capacité respiratoire. Chez les levures cultivées en anaérobiose, elle est nulle et elle augmente après l'aération de 59 R dans le tampon. Le glucose stimule l'adaptation de la respiration, tandis que le séjour en anaérobiose est sans effet. Tous ces résultats sont en accord avec les expériences décrites dans le paragraphe 4.3. Bien que les capacités fermentaires des quatre cultures (59 R, 59 RA, aérobies et

anaérobie) aient été sensiblement les mêmes immédiatement après leur séparation du milieu nutritif, leur évolution ultérieure a été très différente. L'incubation dans le tampon n'influence pas les caractéristiques métaboliques des cultures aérobies de 59 R ou 59 RA. Pour la culture anaérobie de 59 R, l'aération dans le tampon ne diminue que faiblement son pouvoir fermentaire, alors qu'une

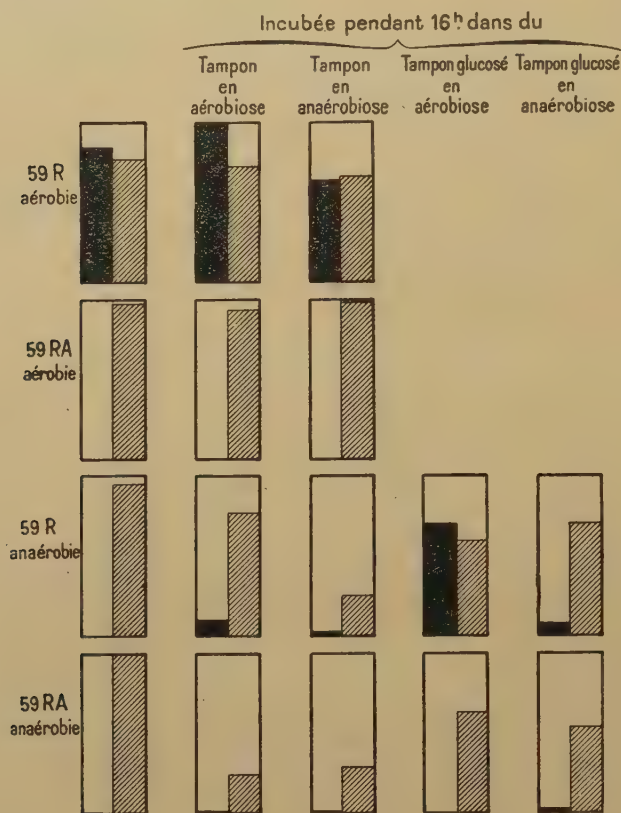


Fig. 38. — Comparaison entre l'évolution des pouvoirs respiratoire et fermentaire des cultures aérobies et anaérobies de 59 R et 59 RA.

Levures cultivées pendant 24 h., milieu 3, modes V et VI. Suspensions incubées soit dans le tampon phosphate M/15, pH 4,6, soit dans le même tampon glucosé à 4 %.

En noir : respiration pendant les premières 60 min. de contact avec le glucose à 4 % ; 100 % corresp. à un $Q_{O_2} = 82$.

Hachuré : fermentation anaérobie pendant les premières 60 min. de contact avec le glucose à 4 % ; 100 % correspondant à un $Q_{CO_2}^{N_2} = 358$.

incubation en absence d'oxygène affecte très sensiblement la valeur du $Q_{CO_2}^N$. Dans le cas de la culture anaérobie de 59 RA, la séparation du milieu nutritif et l'incubation dans le tampon amène une diminution du pouvoir fermentaire quelle que soit l'atmosphère au cours de cette incubation. L'incubation dans le tampon glucosé empêche la perte de la capacité fermentaire.

Les résultats de cette expérience suggèrent une explication du phénomène de la perte du pouvoir fermentaire. Tout se passe comme si la séparation des levures de leur milieu nutritif était suivie de la destruction d'un facteur nécessaire à la fermentation. Au cours de la croissance en anaérobiose, les cellules se carenceraient en ce facteur ou bien ce facteur deviendrait instable, tandis que la croissance aérobie n'aurait pas le même effet. Après la séparation du milieu nutritif, la destruction de ce facteur se produirait uniquement en absence d'une source d'énergie utilisable : *a*) chez la levure normale, qui peut obtenir l'énergie nécessaire aux synthèses grâce à la respiration des réserves endogènes, la destruction aurait lieu uniquement en anaérobiose ; *b*) chez le mutant, qui n'est pas capable d'utiliser ses réserves endogènes quelle que soit l'atmosphère, elle se produirait aussi bien en anaérobiose qu'en aérobie et *c*) l'addition d'une source utilisable d'énergie (glucose) empêcherait la perte. Cette interprétation cadre avec l'observation que la levure dont la croissance anaérobie est arrêtée depuis un temps prolongé fermente le sucre moins vite (tableau XXXVI) et, après séparation du milieu nutritif, perd le pouvoir fermentaire plus rapidement que la même levure cultivée en anaérobiose pendant un temps plus court. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour établir cette corrélation avec toute la certitude désirable.

L'ensemble de ces résultats constitue un bon exemple des interrelations qui existent entre les systèmes respiratoire et fermentaire et, d'autre part, montre que l'oxygène joue un rôle important, même chez une levure à déficience respiratoire.

L'instabilité de la constitution chimique des cellules de levure séparées de leur milieu nutritif a été observée par plusieurs auteurs. Depuis le travail de PETT (1935) on sait que la levure aérée dans du tampon phosphate perd graduellement sa riboflavine. STIER et MAC INTYRE (1942) ont étudié la cinétique de ce phénomène et ont trouvé une diminution de 30 % environ au bout de 10 heures à 25°. La seule corrélation qu'ils aient pu établir était celle de la perte de la riboflavine avec la « vacuolisation » progressive d'une fraction des cellules. Leurs expériences tendent à montrer que les populations de levures sont hétérogènes quant à l'état physiolo-

gique des cellules. Le même point de vue est souligné dans le travail de STIER et SPRINCE (1941) sur le métabolisme glucidique de levures « inanitiées » par aération prolongée dans du tampon (3 jours à 25°). L'inanition a pour effet de diminuer considérablement le métabolisme aérobie du sucre (mesuré par la synthèse du glycogène et par la quantité totale de glucose consommé), tandis que le métabolisme anaérobie n'est pas influencé de façon appréciable. Les auteurs considèrent la réduction de l'activité aérobie non pas comme un effet Pasteur, mais comme un résultat de la diminution de la teneur en riboflavine.

Le phénomène discuté dans ce paragraphe se distingue, par son ampleur inattendue (diminution de la fermentation de 93 % en moyenne au bout de 20 h. à 28°) et par le fait qu'il concerne le métabolisme anaérobie du glucose, de ceux décrits par les auteurs cités. La nature du facteur nécessaire à la fermentation est pour l'instant inconnue. Il est intéressant de rappeler que, parallèlement à la perte du pouvoir fermentaire, on constate une diminution de la teneur en cytochrome b_1 et en protohèmes (tableau XXXIX). On pourrait voir là une indication en faveur de l'intervention d'un système héminique dans la conservation du pouvoir fermentaire. On admet généralement que les hèmes ne peuvent jouer aucun rôle direct dans la fermentation alcoolique de la levure, car celle-ci n'est pas inhibée par le KCN et le CO. Notons cependant que l'intervention d'un système héminique dans la fermentation anaérobie d'autres organismes paraît assez probable (chez *Clostridium Welchii*, p. ex.). En effet, leur fermentation est sensible au CO (KUBOWITZ, 1933 ; WARBURG, 1948) et les organismes carencés en fer présentent des changements profonds du catabolisme du glucose (PAPPENHEIMER et SHASKAN, 1944). De même, chez *Cl. tetani*, la fermentation alcoolique est diminuée après croissance dans un milieu pauvre en fer (LERNER et MUELLER, 1949).

Il est, d'autre part, entièrement possible que notre facteur de fermentation soit en relation avec le facteur Z de EULER et MYRBÄCK (1924, 1928). Ces auteurs ont trouvé que l'addition de moût de bière ou d'eau de levure stimule considérablement la fermentation des cellules intactes et que la substance active est différente de la cozymase et des vitamines connues. MEYERHOF et IWASAKI (1930) ont confirmé ces résultats et ont montré que le facteur Z est excrété par la levure vivante dans le milieu. Sa nature exacte reste à déterminer.

L'expérience suivante, destinée à aborder l'étude des conditions dans lesquelles une levure qui a perdu sa capacité fermentaire peut la

TABLEAU XL

Action de diverses vitamines sur la fermentation anaérobie de 59 RA aérée dans du tampon phosphate. (Pour les détails, v. § 4.41.)

Temps	CO ₂ dégagé (en mm ³) dans du tampon phosphate glucosé à 4 %, additionné de							
	Eau	Solution de vitamines	Biotine 0,3γ	β-alanine 300γ	Panthoténate de Ca 360γ	Pyridoxine 60γ	Thiamine 25γ	Extrait de levure Difco 300γ
60 min.	47	44	45	48	51	47	49	55
120 min.	128	130	127	129	131	131	143	213
180 min.	209	230	213	206	233	219	245	380

Par fiole : 1,08 mg ps de 59 RA cultivée en anaérobiose puis aérée dans du tampon phosphate M/15 pH 4,6 pendant 21 heures. Solution de vitamines : B₁ 10γ ; B₂ 5γ ; pyridoxine 6γ ; ac. nicotinique 5γ ; panthoténate 36γ ; adénine 90γ ; uracil 90γ ; biotine 0,05γ.

recupérer, met en évidence l'action stimulante de l'extrait de levure Difco. Une culture anaérobie de 59 RA, qui a perdu 85 % de son pouvoir fermentaire à la suite de l'aération dans du tampon phosphate, a été additionnée de plusieurs vitamines et sa fermentation en présence de sucre a été mesurée (tableau XL). Seul l'extrait de levures a été capable d'augmenter la vitesse de dégagement du CO₂ et cet effet ne semble pas être dû à la multiplication des cellules.

4.5. EXCRÉTION DES PORPHYRINES EN AÉROBIOSE ET EN ANAÉROBIOSE

Les variations de la constitution enzymatique décrites dans le présent travail concernent surtout le métabolisme des hémoprotéines. La biosynthèse d'une hémoprotéine passant vraisemblablement par un stade où le noyau tetrapyrrolique ne comporte pas de métal, il nous a paru intéressant de voir si on pouvait mettre en évidence des variations du métabolisme des porphyrines libres, dues soit à des différences génotypiques, soit à des différences phénotypiques.

4.51. Méthodes d'analyse des porphyrines

Principe. Les analyses ont été effectuées en comparant dans l'ultraviolet les spectres d'absorption des porphyrines formées par la levure avec celui d'une solution standard d'hydrochlorure d'hématoporphyrine synthétique. Les dosages ont été faits soit après extraction des porphyrines du milieu de culture, soit directement sur les liquides surnageants des cultures. Les résultats sont exprimés

en molécules grammes en admettant que le ε_M des porphyrines excrétées par la levure (à 402 $m\mu$) est identique au ε_M de l'hématoporphyrine (à 402 $m\mu$). Ce mode d'expression ne préjuge en rien de la nature des porphyrines excrétées.

L'hématoporphyrine a été préparée à partir d'hémine cristallisée, selon la méthode de FISCHER (1924), modifiée par PAPPENHEIMER (1947). Le produit a été recristallisé deux fois et séché sous vide. Ses propriétés spectroscopiques ont été étudiées après dissolution dans HCl N et on a trouvé $\varepsilon_{mM}^{\sim}$ à 402 $m\mu$ = 351, ε_{mM} à 394 $m\mu$ et 410 $m\mu$ = 121. Notons que la première de ces valeurs est pratiquement identique à celle (346) obtenue par PAPPENHEIMER (1947).

La figure 40 montre le spectre de notre solution standard, entre 390 et 430 $m\mu$. Sur la figure 39, on voit que l'extinction de solutions d'hématoporphyrine suit, dans l'intervalle $E_{402} = 0$ et $E_{402} = 0,8$, la loi de BEER-LAMBERT.

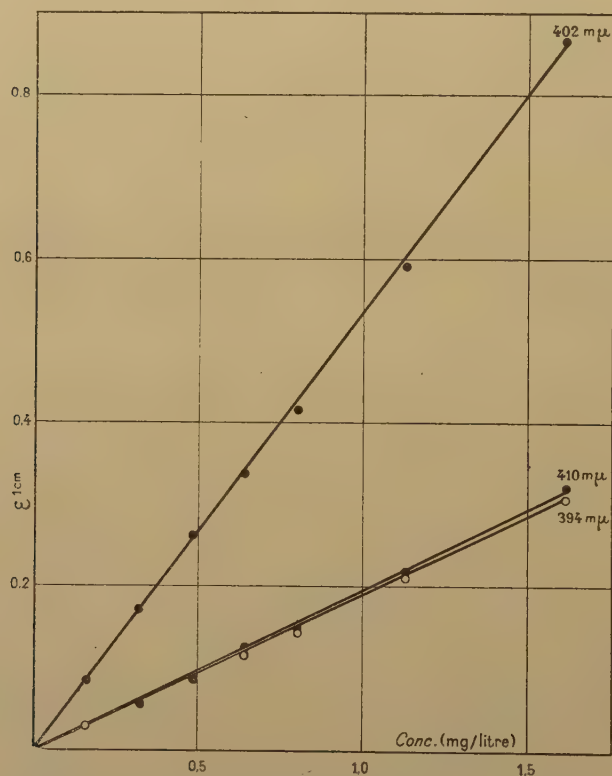


Fig. 39. — Extinction en fonction de la concentration de l'hématoporphyrine synthétique dans HCl N.

Dosage des porphyrines dans les liquides surnageants des cultures sans extraction préalable. La figure 40 montre les spectres d'absorption de quelques liquides surnageants et les spectres des porphyrines extraites de ces derniers, dans le milieu chlorhydrique N. On y voit clairement que le spectre des liquides surnageants est composé d'une partie spécifique, due aux porphyrines, et d'une partie non spécifique (« absorption de base »). Il est évident que, si l'on connaissait

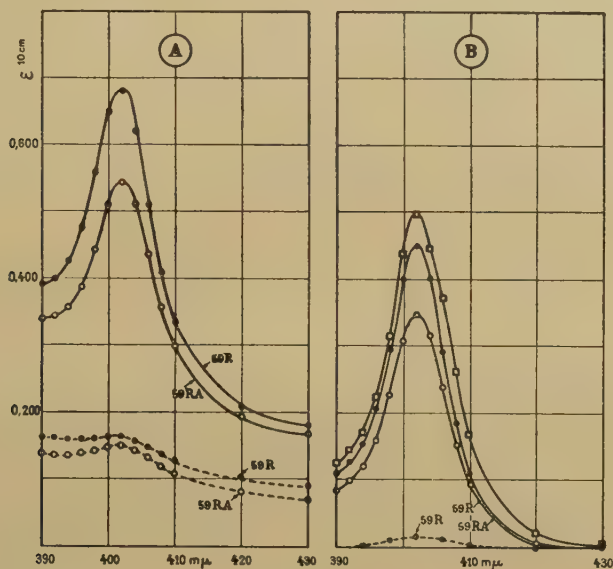


Fig. 40.

A. Spectres d'absorption des liquides surnageants de cultures dilués 1,1x avec HCl 11 N.

Cultures de 89 h. dans le milieu 5.

B. Spectres d'absorption des extraits provenant des liquides surnageants de cultures représentés en A. Les extraits (dans HCl N) sont amenés au volume initial du liquide surnageant de culture. Trait plein : culture en anaérobiose, mode V ; trait pointillé : culture en aérobiose, mode IV ; carrés : solution $1,41 \times 10^{-7}$ M de l'hématoporphyrine synthétique dans HCl N.

(Pour les détails, v. § 4.51.)

cette dernière, une simple soustraction fournirait les valeurs de l'absorption spécifique. Le procédé généralement employé (PAPPENHEIMER, 1947) consiste à admettre que l'absorption de base est pratiquement constante par rapport aux variations de la partie spécifique du spectre. Cependant, dans nos expériences,

l'absorption de base varie considérablement au cours de la croissance et selon le mode de culture (comparer courbes AE et AN, fig. 39), de sorte que l'emploi de ce procédé nous a été interdit. Nous avons mis au point une autre méthode d'estimation qui se révéla suffisamment précise pour permettre la plupart des dosages. Elle est fondée sur le fait que l'assimilation de l'absorption de base à une droite introduit une erreur qui n'est pas très importante à condition que l'intervalle choisi du spectre ne soit pas trop grand et que le rapport des absorptions, spécifique et totale, ne soit pas trop petit. On a choisi pour la mesure les points équidistants, du maximum d'absorption, 394 m μ et 410 m μ , et, connaissant les rapports ε_M à 394 m μ / ε_M à 402 m μ , et ε_M à 410 m μ / ε_M à 402 m μ pour l'hématoporphyrine, on a pu calculer la concentration des porphyrines dans des liquides surnageants de culture (milieu HCl N) selon la formule

$$\text{concentration des porphyrines (en M)} = \frac{2 E_{402}^{1 \text{ cm}} - (E_{394}^{1 \text{ cm}} + E_{410}^{1 \text{ cm}})}{1,313 \times 3,51 \times 10^5}$$

La culture destinée au dosage est centrifugée pendant 15 minutes à 3.500 tours, le liquide surnageant est décanté et dilué $1,1 \times$ avec HCl 11 N, et l'extinction est mesurée (fente de 0,06 mm). On utilise comme témoin le HCl N. Afin d'avoir des lectures de E_{402} entre 0,1 et 0,6, on utilise des cuves de 1,2 ou 10 cm de longueur de traversée. Afin de vérifier la validité de cette méthode d'estimation, nous avons ajouté des quantités connues d'hématoporphyrine à différents milieux et filtrats de culture présentant des absorptions de base très variées. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau XLI. Il en ressort que, lorsque $E_{402} \text{ porph.} / E_{402} > 0,3$, la concordance entre les valeurs théoriques et observées est très bonne ($\pm 5 \%$), tandis que, lorsque ce rapport diminue, l'emploi de la formule conduit à une surestimation de la teneur en porphyrines. La deuxième vérification de la formule ci-dessus nous a été donnée par son emploi simultané avec le dosage après l'extraction étherée des porphyrines. Le tableau XLIII montre que les différences entre les valeurs fournies par les deux méthodes ne dépassent pas 10 %.

Dosage des porphyrines dans les liquides surnageants des cultures par extraction à l'éther. La technique utilisée dérive des techniques classiques (cf. THOMAS, 1938 ; PAPPENHEIMER, 1947). 50 cm³ de liquide surnageant sont additionnés de 14 cm³ d'acide acétique glacial et extraits avec 100 cm³ d'éther en trois fois (40 cm³ +

TABLEAU XLI

Vérification de la validité du dosage des porphyrines sans extraction préalable.

(Pour les détails, v. § 4.51.)

Filtrat de culture	Addition	E ¹ cm			(d) E ¹ cm porph. 402	(e) Porphyrines M × 10 ⁻⁷	(d) (b)	Résultats : porphyrines ajoutées M × 10 ⁻⁷
		(a) 394 mμ	(b) 402 mμ	(c) 410 mμ				
A	HCl N	0,042	0,039	0,037	0	0		5,27 = 97 %
	5,43 × 10 ⁻⁷ M porphyrines dans HCl N	0,112	0,230	0,105	0,185	5,27	0,80	
B	HCl N	0,140	0,135	0,123	0,005	0,12		1,90 = 102 %
	1,86 × 10 ⁻⁷ M porphyrines dans HCl N	0,160	0,200	0,147	0,071	2,02	0,36	
C	HCl N	0,416	0,366	0,314	0,002	< 0,05		4,05 = 108 %
	3,72 × 10 ⁻⁷ M porphyrines dans HCl N	0,446	0,497	0,359	0,144	4,10	0,28	
D	HCl N	0,126	0,121	0,111	0,004	0,11		0,69 = 115 %
	0,60 × 10 ⁻⁷ M porphyrines dans HCl N	0,130	0,142	0,117	0,028	0,80	0,20	

Les valeurs consignées dans les colonnes (d) et (e) sont calculées d'après la formule donnée à la p. .

30 cm³ + 30 cm³). Les portions éthérées réunies subissent 5 lavages avec 100 cm³ d'eau à chaque fois. Afin de briser l'émulsion et de faciliter le passage du pigment, on ajoute à chaque extraction 1 à 3 cm³ d'alcool. Enfin, les porphyrines sont extraites par 35 cm³ d'HCl N en deux fois (20 + 15 cm³) et dosées spectrophotométriquement. On utilise comme témoin l'extrait du milieu nutritif.

Les extractions de quantités connues d'hématoporphyrine synthétique additionnées aux milieux nutritifs permettent de récupérer en moyenne 74 % de la porphyrine ajoutée (tableau XLII). Les quantités de porphyrines extraites au cours des diverses expériences ont été corrigées en admettant que le pourcentage des pigments récupérés est le même que pour l'hématoporphyrine.

TABLEAU XLII

Extraction de l'hématoporphyrine synthétique additionnée aux milieux de culture.
(Pour les détails, v. § 4.51.)

Milieu	Hématoporphyrine (en γ)		Récupération en %
	additionnée	extraite	
N° 3	3,24	2,48	75,7
	0,324	0,261	80,6
N° 5	3,24	2,29	70,6
	0,648	0,476	73,4
N° 5	3,94	2,83	71,9
	1,97	1,46	74,0
Moyenne			74,4

4.52. Excrétion des porphyrines

La figure 41 montre les résultats d'une expérience où la croissance et l'accumulation des porphyrines dans le milieu ont été suivies simultanément. La souche 59 R a étéensemencée dans le milieu synthétique 5 à raison de 9 mg ps/litre et le milieu réparti dans des « tubes à barbotage » aérés par passage d'air comprimé (mode de culture IV). Une autre partie du même milieu a été introduite dans des fioles d'Erlenmeyer à soupapes de mercure et l'anaérobiose établie par passage d'azote. Les tubes à barbotage et les fioles d'Erlenmeyer ont été incubées à l'étuve à 28°, et des échantillons destinés aux déterminations de la croissance (néphélométrie) et des porphyrines (extraction à l'éther) ont été prélevés de temps en temps. On voit que la quantité de porphyrines accumulées dans la culture aérée est très faible au cours de toutes les phases de la croissance : elle est presque nulle pendant la phase exponentielle, et augmente légèrement après l'arrêt de la croissance. Par contre, dans la culture anaérobie, l'accumulation des porphyrines est considérable : elle augmente au cours de la phase exponentielle et au début du plateau d'arrêt et ne s'arrête que dans les dernières heures de la culture. Deux constatations intéressantes peuvent être tirées de l'étude de la figure 41 : a) Dans l'intervalle 0-20 heures, la croissance en anaérobiose ⁽¹⁾ a été pratiquement identique à celle en aérobiose, tandis que la quantité de porphyrines accumulées dans le milieu

(1) Il est à noter que dans cette expérience particulière, l'anaérobiose a été établie par passage d'azote pendant 15 minutes seulement, et de ce fait était peut-être incomplète.

était de 10 fois supérieure en absence d'oxygène qu'en sa présence. Nous pouvons donc dissocier les effets de l'oxygène sur l'excrétion des porphyrines de son action sur la multiplication de la levure. *b)* Une fois la croissance terminée, la quantité de porphyrines formées est plus grande en anaérobiose qu'en aérobiose ; et, puisque la valeur de la croissance maxima est supérieure en présence d'oxygène, le rapport *porphyrines formées/levure formée* est beaucoup plus grand en anaérobiose qu'en aérobiose.

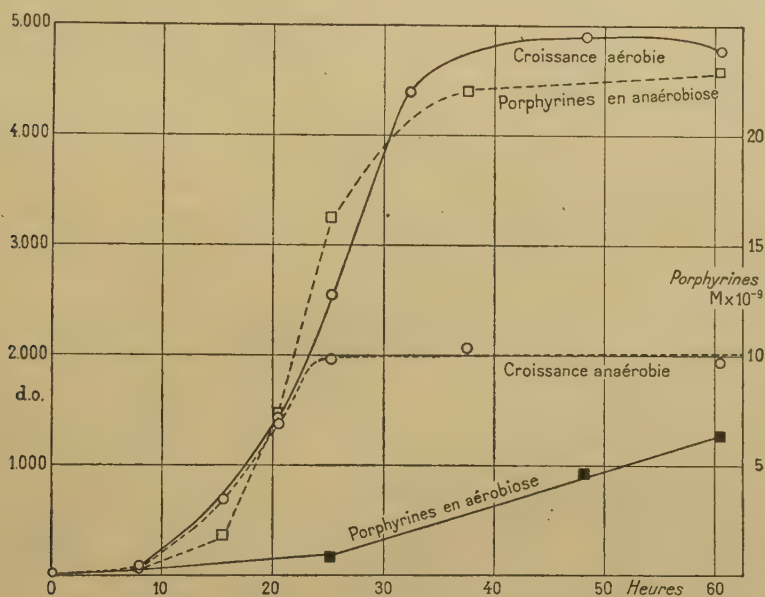


Fig. 41. — Excrétion des porphyrines au cours de la croissance (pour les détails, v. § 4.52).

Levure 59 R cultivée dans le milieu 5, mode IV ou V.

Plusieurs problèmes se posent à la suite de cette constatation. Dans l'expérience qui vient d'être décrite, ainsi que dans celles résumées dans le tableau XLIII, les porphyrines sont dosées dans le liquide surnageant après centrifugation de la culture. Or, on sait que certaines porphyrines (en particulier les coproporphyrines) peuvent être adsorbées à la surface des cellules de levure (FINK, 1929). Il fallait donc vérifier que la plus faible quantité de porphyrines trouvée en aérobiose n'était pas due à leur adsorption. Il n'en est pas ainsi, car les lavages successifs à froid avec KOH puis avec HCl dilués, préconisés par FINK (*l. c.*), ne libèrent que des quantités négligeables de porphyrines.

TABLEAU XLIII

Excrétion des porphyrines par les souches 59 R et 59 RA.

Souche	Expérience	Conditions de culture		Aérobiose			Anaérobiose		
		Milieu et mode	Durée heures	A	B	C	A	B	C
59 R	P ₁	N° 3, mode VI et VII	0	0,15	(0)	(0)	0,15	0	(0)
			10	5,1	(9)	(1,8)	3,54	(32)	(9)
			14	12,7	(28)	(2,2)	5,35	(160)	(30)
	P ₂₃	N° 3, mode VII	0 23				0,03 3,45	0 202	0 59
	P _{2-P3}	N° 5, glucosé à 2,7 % mode IV et V	0	0,01	0	(0)	0,01	(0)	(0)
			37,5	—	—	—	1,04	(22,0)	(21,1)
			48,3 60,5	2,45 2,32	(4,7) (6,2)	(1,9) (2,7)	— 0,97	— (22,9)	— 25,4
	P ₄	N° 5, glucosé à 5,4 % ; mode V	0 89				0,012 0,740	0 105 (115)	0 142 (156)
		Idem, mais sans riboflavine	0 89				0,012 0,695	0 117 (120)	0 169 (173)
	P ₈	N° 5, glucosé à 5,4 % mode IV et V	0	0,018	0	0	0,018	0	0
			41	0,545	1,3	2,4	0,535	28,1	52,5
			65 89	1,47 1,97	8,5 9,5	5,8 4,8	0,795 0,990	46,5 145 (128)	58,5 147 (125)
59 RA	P ₈	Idem	0	0,018	0	0	0,018	0	0
			41	0,565	2,5	4,4	0,670	28,7	43
			65	1,150	11,4	10	0,940	47,7	51
			89	1,415	13,6	9,6	0,950	103 (101)	108 (106)

Colonne A : croissance en g ps/l mesurée néphélométriquement.

Colonne B : concentration des porphyrines (en $M \times 10^{-6}$) dans le liquide surnageant de culture ; valeurs entre parenthèses : dosage après l'extraction à l'éther ; valeurs sans parenthèses : dosage sans extraction.Colonne C : B/A en moles de porphyrines $\times 10^{-6}$ /g ps. levure.

L'absence d'accumulation de porphyrines en aérobiose peut être due soit à ce qu'elles ne sont pas libérées, soit à ce qu'elles sont détruites ou métabolisées en présence d'oxygène. Nous avons soumis cette hypothèse à l'expérience, en ajoutant à une culture aérée le liquide surnageant d'une culture anaérobie, dont la teneur en porphyrines a été mesurée. Six heures plus tard, les cultures aérobies, additionnées ou non de porphyrines, ont été centrifugées et leurs teneurs en porphyrines estimées. On a retrouvé, à peu de choses près, la quantité de porphyrines ajoutées. Il nous paraît donc permis de conclure qu'en anaérobiose, les porphyrines sont excrétées dans le milieu, tandis qu'en présence d'oxygène, elles ne le sont pas.

L'expérience P8 (tableau XLIII) a été destinée à comparer les souches normale et mutante. Il en ressort que les deux souches se comportent de façon tout à fait semblable : dans les deux, l'excrétion des porphyrines est très faible en aérobiose, et dix à vingt fois plus forte en absence d'oxygène. Il est important de noter qu'en aérobiose, 59 RA ne libère pas plus de porphyrines que 59 R. Nous discuterons page 170 la signification de ce résultat.

Enfin, une série d'expériences devait nous renseigner sur le rôle joué dans l'excrétion des porphyrines par la composition du milieu de culture. Tout d'abord, nous avons étudié l'action des diverses vitamines et facteurs de croissance. Aucune influence n'a pu être décelée (tableau XLIII, expériences P 1, 2, 4 et 8). La concentration des porphyrines en anaérobiose est sensiblement égale dans le milieu naturel contenant une forte dose d'extrait de levure Difco et dans les milieux synthétiques, tandis que la valeur de la croissance maxima est nettement meilleure en milieu naturel. Contrairement à ce que STICH (1950, 1951) a trouvé récemment pour la « coproporphyrine » de *Saccharomyces anamensis*, l'addition de riboflavine n'influence en rien l'excrétion des porphyrines en anaérobiose. L'emploi, en anaérobiose, du milieu synthétique minimum (β -alanine + biotine) n'a pas été possible, car il ne permet qu'une croissance résiduelle très faible (§ 4.2).

La concentration du glucose joue un rôle important. En comparant les expériences P2 et P4, on constate qu'en doublant la concentration du sucre, on trouve quatre fois plus de porphyrines excrétées (tableau XLIII). Pour mieux étudier cette relation, nous avons effectué une expérience dans laquelle nous avons mesuré la quantité de porphyrines formées, après l'épuisement du sucre du milieu, en fonction de la concentration initiale du glucose. Les résultats sont donnés par la figure 42. En présence d'oxygène, la croissance est proportionnelle à la quantité de glucose jusqu'à une concentration

de 1 % : la droite de régression passe par l'origine des coordonnées. Autrement dit, le rendement de croissance est limité, dans cet intervalle, par un seul facteur qui est le sucre. Au delà de 1 %, le rendement n'est plus limité par le sucre, qui n'est vraisemblablement pas épuisé à l'arrêt de la croissance. L'excrétion des porphyrines est très faible, quelle que soit la quantité de glucose dans le milieu. Il en est tout autrement pour la culture anaérobie. Pour aucune des concentrations étudiées, le sucre n'est le seul facteur limitant le rendement final de croissance et, au-dessus de 1,5-2 % de glucose, il ne l'augmente pas. La quantité de porphyrines libérées suit, en fonction de la concentration du sucre, une courbe à allure composite, présentant en son milieu un changement de pente, ce qui permet de la décomposer en trois parties. Le premier tronçon de la courbe, qui va jusqu'à la concentration de 1,5 % de glucose, montre que la concentration des porphyrines excrétées est sensiblement proportionnelle à la concentration du sucre ; ce tronçon est suivi d'un palier où les porphyrines augmentent très peu par rapport au sucre ; enfin, un troisième segment, à pente forte, témoigne d'une augmentation rapide de la quantité des porphyrines. Les concen-

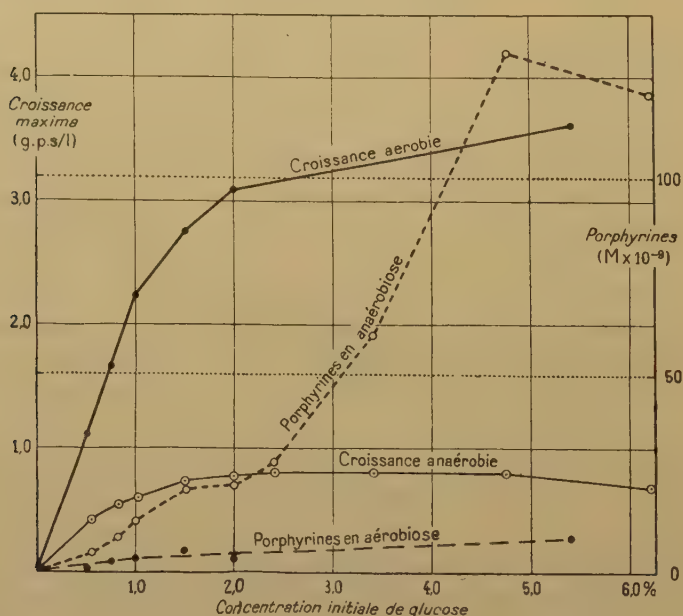


Fig. 42. — Excrétion des porphyrines en fonction de la quantité de glucose.

Levure 59 R cultivée pendant 89 h. dans le milieu 5, mode IV ou V.

trations supérieures à 6 % semblent avoir un effet inhibiteur sur la production des porphyrines aussi bien que sur la croissance. La discontinuité de cette fonction montre que l'excrétion des porphyrines en anaérobiose n'est pas un phénomène simple, et le fait que le palier coïncide avec les concentrations en sucre (1,5-2,0 %) au-dessus desquelles il n'y a plus d'augmentation de la quantité de matière vivante formée, indique une relation étroite entre l'utilisation du sucre disponible pour la croissance et pour la porphyrinogénèse. Tout se passe comme si, pour des concentrations de sucre allant jusqu'à 1,5 %, une fraction constante de ce dernier était transformée en porphyrines. A partir du moment où un surplus de glucose est disponible (concentrations > 2 %) et l'accroissement de la matière vivante n'a plus lieu, les porphyrines seraient excrétées plus abondamment, une fraction plus importante du sucre étant transformée en porphyrines.

Selon cette interprétation, l'addition de glucose à une suspension de cellules non proliférantes devrait, en absence d'oxygène, stimuler l'excrétion des porphyrines tandis qu'en aérobiose elle devrait être sans effet. L'expérience montre qu'il en est bien ainsi (tableau XLIV). Une culture anaérobie de 59 R en milieu naturel 3 a été prélevée en phase de croissance active et lavée trois fois avec du tampon. La suspension cellulaire ainsi obtenue a été répartie dans des tubes à barbotage (passage d'air comprimé) et dans des fioles d'Erlenmeyer (passage d'azote). On voit que l'incubation anaérobie

TABLEAU XLIV

Excrétion des porphyrines en absence de multiplication cellulaire.
(Pour les détails, v. § 4.52.)

Incubation dans	Aérobiose				Anaérobiose			
	d. o.		Porphy- rines (Mx 10 ⁻⁹)		d. o.		Porphy- rines (Mx 10 ⁻⁹)	
	0 h.	5 h.	0 h.	5 h.	0 h.	4 h.	0 h.	4 h.
Tampon phosphate 0,067 M pH 4,6	26.100	28.000	0	< 0,5	26.100	25.000	0	9,4
Idem + glucose à 5,4 %	26.100	37.500	0	4	26.100	29.500	0	72
Constante saline du mi- lieu N° 2	26.100	26.600	0	1	26.100	25.400	0	11
Milieu N° 5 sans bio- tine, glucosé à 5,4 %	26.100	34.100	0	7	26.100	26.200	0	45

en présence de glucose provoque une stimulation considérable de l'excrétion des porphyrines, sans qu'il y ait multiplication cellulaire. Le remplacement du tampon phosphate par un mélange de sels, d'une source d'azote et de fer, n'inhibe pas l'excrétion des porphyrines. L'effet porphyrinogène du glucose, bien qu'un peu plus faible, se retrouve aussi en présence d'un mélange de plusieurs vitamines. Les quantités de porphyrines trouvées sont 10 à 15 fois plus faibles en aérobiose qu'en anaérobiose.

4.53. *Nature des porphyrines excrétées*

Nous ne possédons à ce sujet que des données préliminaires. Elles constituent néanmoins une première indication sur la nature des porphyrines excrétées. Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet et la solubilité dans l'éther et le HCl montrent bien qu'il s'agit de porphyrines libres et non de métalloporphyrines. La concordance entre les valeurs fournies par l'extraction étherée et le dosage sans extraction indique que plus de 90 % des porphyrines excrétées sont éthérosolubles ; ce n'est donc pas l'uroporphyrine qui est excrétée. Enfin, le fait que l'acide chlorhydrique à 0,54 % extrait la presque totalité des porphyrines de la phase étherée montre qu'il ne s'agit pas de protoporphyrines, qui passent dans la phase acide seulement lorsque la concentration de HCl est supérieure à 2 % (cf. ZEILE et RAU, 1937). Les porphyrines formées en anaérobiose peuvent donc être des copro-, deuto-, hémato- ou meso-porphyrines pour ne parler que des porphyrines naturelles.

4.54. *Discussion*

Les porphyrines de la levure ont été étudiées par de nombreux auteurs (FISCHER et coll., 1924-27 ; FINK, 1929 ; RIMINGTON, 1943 ; KENCH et WILKINSON, 1945-46 ; STICH, 1950-51), mais leurs travaux étaient centrés surtout sur l'aspect purement chimique du problème, de sorte que nos connaissances sur le métabolisme de ces substances sont à peu près nulles. FISCHER et coll. (*l. c.*) ont isolé de la levure des petites quantités de protoporphyrine IX (isomère III, cf. FISCHER et ORTH, 1937) et de coproporphyrine (isomère I). KENCH et WILKINSON (1945) ont identifié dans les autolysats de levure l'isomère III de la coproporphyrine. Il est probable que la protoporphyrine ne se trouve pas à l'état libre dans la cellule, mais dérive des hémoprotéines respiratoires. La coproporphyrine, au contraire, est excrétée sous forme non-conjuguée (FISCHER et coll., FINK, *l. c.*) et parfois en très grande quantité (1,6 mg coproporphyrine/g p.h. levure : STICH et EISGRUBER, 1951). Les conditions dans lesquelles cette forte « coproporphyrine » a lieu sont mal connues.

Il est regrettable que les travaux sur la « coproporphyrine » de la levure (FISCHER, FINK, STICH, *l. c.*) aient été effectués sur des cultures qui interdisent toute interprétation physiologique (cultures âgées de plusieurs semaines ou mois dans des milieux qui permettent, tout au plus, quelques jours de croissance active). Notons seulement que, d'après FINK (1929), les « copro-levures » présentent une respiration normale et leurs cytochromes ne diffèrent pas des cytochromes classiques, tandis que, d'après STICH (1950-51), la quantité d'hémine chez une telle levure est considérablement diminuée.

L'excrétion des porphyrines au cours de la croissance active de la levure dans des milieux naturels et synthétiques, ainsi que par des cellules non-proliférantes (décrite ici) nous semble donc d'un certain intérêt. Elle montre qu'en anaérobiose, ces substances font partie des produits finaux du métabolisme *physiologique* de *S. cerevisiae*. La relation avec la quantité de sucre disponible prouve que c'est parmi les intermédiaires de la fermentation anaérobie du glucose qu'il faut chercher les précurseurs des porphyrines. Cette façon de voir est appuyée par les données récentes sur la biosynthèse de l'hémoglobine, obtenues avec les isotopes, dont il ressort que le noyau tétrapyrrolique est formé par condensation de fragments en C_2 ou C_4 (SHEMIN et WITTENBERG, 1951).

Nous avons vu qu'en milieu aéré l'excrétion des porphyrines est 10 à 20 fois plus faible qu'en anaérobiose et que la teneur en hémoprotéines intracellulaires de la levure aérobie est plus élevée que celle de la levure anaérobie. Reprenant sur *B. cereus* notre étude sur le rôle de l'oxygène dans la formation des enzymes respiratoires, SCHAEFFER (1950) a trouvé que l'anaérobiose a le même effet sur cet organisme que sur la levure : diminution de la teneur en hémoprotéine et excrétion de porphyrines. Il a formulé l'hypothèse selon laquelle l'excrétion des porphyrines est due à la non-utilisation des groupes tétrapyrroliques formés par les cellules incapables d'effectuer la synthèse des hémoprotéines. On aurait donc une situation analogue à celle découverte par PAPPENHEIMER (1947) chez *Corynebacterium diphtheriae* où la carence en fer provoque une excrétion des porphyrines couplée avec une diminution de la teneur en cytochrome *b*. Ce point de vue, pour tentant qu'il soit, nécessite quelques réserves :

a) Chez la levure et chez *B. cereus*, la diminution des pigments respiratoires correspond à une diminution en protoporphyrine, mais les porphyrines excrétées n'appartiennent pas à cette catégorie. Etant donné que la dégradation par la levure des proto-hémopro-

téines, telles que le cytochrome *c* et la catalase ne donne pas naissance aux porphyrines éthérosolubles (KENCH et WILKINSON, 1946), il faut conclure que l'excrétion de celles-ci en anaérobiose n'est due ni au catabolisme des chromoprotéines, ni à celui de la protoporphyrine. Autrement dit, le manque d'oxygène aurait pour effet de dévier la synthèse de certains tétrapyrroles à partir d'un précurseur commun vers une autre voie. Que cette déviation n'est pas totale, découle de nos résultats qui montrent que la synthèse du protohème, bien que plus faible, persiste en anaérobiose (§ 4.31) et que la disparition des cytochromes *b* et *c* ne semble pas être due à la non-formation des groupements prosthétiques (§ 4.6).

b) Le comportement de la souche mutante mérite aussi l'attention. En anaérobiose, cette souche ne se distingue pas de la souche normale, mais en aérobiose, bien qu'elle ne forme pas de cytochrome *b* et que sa teneur en protohème soit plus faible, elle n'excrète pas plus de porphyrines que 59 R. Ceci montre, d'une part, que les mécanismes ayant pour effet la disparition du cytochrome *b* et la diminution du protohème sont différents chez la souche mutée et chez la souche normale proliférant en anaérobiose ; d'autre part, que la diminution de la teneur en protohème ne conduit pas obligatoirement à une excrétion des porphyrines. On peut penser que les porphyrines libérées en anaérobiose proviennent de la déviation de l'anabolisme du cytochrome *c* seul. Cette supposition rend compte de l'absence d'excrétion des porphyrines par le mutant en présence d'air ainsi que de la différence observée par SCHAEFFER (1950) entre *B. cereus* et *E. coli*. Elle est appuyée par les résultats de PAUL (1949, 1950) qui pense que le groupement prosthétique du cytochrome *c* est un isomère de l'hématohématine, et que la porphyrine libre qui en dérive est l'hématoporphyrine.

c) Enfin, comme on l'a vu page 166, la formation des porphyrines excrétées à partir du glucose n'est pas un phénomène simple et il semble probable que plusieurs mécanismes y participent. Il est intéressant de rappeler à ce sujet que, dans les autolysats de levures inanitiées, c'est la formation de la coproporphyrine III qui prédomine, tandis qu'en présence de glucose c'est la coproporphyrine I qui est synthétisée (KENCH et WILKINSON, 1945).

4.6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

1. La constitution enzymatique de la levure est rigoureusement déterminée par les conditions d'aération. Résumons brièvement l'ensemble des phénomènes qui viennent d'être décrits. La levure de boulangerie normale qui a proliféré pendant un temps relativement court en absence d'oxygène, perd presque complètement le

pouvoir d'oxyder le sucre, mais conserve le pouvoir fermentaire. Sa constitution enzymatique subit un profond remaniement : les cytochromes a , b , c , disparaissent et à leur place apparaissent des constituants nouveaux, a_1 et b_1 ; l'activité de certains systèmes enzymatiques diminue considérablement (cytochrome $c \rightarrow O_2$, lactate $\rightarrow$ cyt. c , succinate $\rightarrow$ cyt. c ; α -glycérophosphate $\rightarrow$ cyt. c ; Co I $H_2 \rightarrow$ cyt. c), l'activité d'autres diminue relativement peu (malate $\rightarrow$ Co I), alors que celle d'autres encore augmente (alcool $\rightarrow$ Co I). Ce remaniement enzymatique est accompagné d'une excrétion notable de porphyrines éthérosolubles.

Chez une telle levure, la formation des enzymes respiratoires peut être induite par l'oxygène en absence de multiplication cellulaire. Elle est accompagnée de la disparition des cytochromes a_1 et b_1 et de la diminution de la teneur en alcool déshydrogénase. La teneur en enzymes, disparus pendant la prolifération anaérobie, s'accroît, et cet accroissement conduit au rétablissement de la capacité respiratoire.

Les limites des variations que peut subir la levure « petite » dans des conditions identiques sont définies par son génotype. Cultivée en anaérobiose, elle ne se distingue pas de la race normale ; mais l'oxygène n'induit chez elle que la formation du cytochrome c ; celle des cytochromes a et b n'a pas lieu, et le pouvoir respiratoire n'est pas rétabli.

Enfin, le potentiel fermentaire de la levure est influencé par la prolifération en absence d'air. A l'encontre des changements subis par le système respiratoire, cet effet ne se manifeste que dans certaines conditions. Les résultats peuvent être interprétés de la façon suivante. Un facteur nécessaire à la fermentation devient instable à la suite de la prolifération en anaérobiose et est rapidement détruit lorsque la levure se trouve en absence d'une source d'énergie. La destruction de ce facteur, qui entraîne la perte du pouvoir fermentaire, se produit dans le cas des « petites » quelle que soit l'atmosphère, alors que, chez les « grandes », elle n'a lieu qu'en anaérobiose. La présence du glucose empêche cette destruction. Le phénomène de la perte de la capacité fermentaire a été discuté dans le paragraphe 4.41.

2. Quel est le mécanisme de la perte des enzymes respiratoires ? Deux interprétations sont possibles *a priori* : le manque d'oxygène a pour effet soit d'accélérer la destruction des enzymes, soit d'inhiber leur synthèse. L'expérience relatée page 137 montre clairement que c'est la deuxième hypothèse qui est juste. En effet, la perte des enzymes respiratoires requiert une multiplication cellulaire active :

on a vu qu'en absence de prolifération, la capacité respiratoire et la quantité d'hémoprotéines restent constantes en anaérobiose. Les enzymes présents au départ ne seraient donc pas détruits, mais « dilués » dans la masse cellulaire qui a cessé de les synthétiser. Un mécanisme analogue a été observé par WAINWRIGHT et POLLOCK (1949) dans le cas de la nitratase. Lorsque *E. coli* qui possède une quantité considérable d'enzyme est cultivée en absence de nitrate, la quantité absolue de nitratase reste constante dans l'ensemble de la population, mais la teneur en cet enzyme des cellules individuelles diminue graduellement.

Enfin, il est évident que la perte des cytochromes, qui requiert la multiplication cellulaire, ne repose pas sur la sélection de mutants car, s'il en était ainsi, on ne devrait pas observer la reconstitution du système respiratoire normal en absence de prolifération.

3. Quel est le mécanisme de l'acquisition des enzymes respiratoires ? Depuis une quinzaine d'années, l'intérêt pour les phénomènes dits « d'adaptation enzymatique » n'a cessé de croître. Ceci s'explique par le fait que ce genre de phénomènes permet d'aborder expérimentalement le mécanisme intime de la biosynthèse des enzymes et par là de mieux comprendre l'origine de la spécificité enzymatique. Comme nous le verrons ci-dessous, la formation des enzymes respiratoires chez la levure peut être assimilée à un tel processus. Nous allons donc commencer notre discussion par un bref aperçu du problème de la « synthèse adaptative des enzymes » (cf. les mises au point de KARSTRÖM, 1937 ; YUDKIN, 1938 ; DUBOS, 1940 ; GALE, 1943, 1946 ; SPIEGELMAN, 1945, 1948, 1951 ; MONOD, 1947, 1949 ; STANIER, 1951).

La définition de l'« adaptation enzymatique » est la suivante : une population de cellules placée en contact avec un substrat spécifique acquiert, au bout d'un certain temps, les enzymes nécessaires pour le métaboliser (SPIEGELMAN, 1948). L'acquisition s'effectue sans changement de génotype et l'essentiel du phénomène consiste dans l'induction, par une substance spécifique, de la formation d'un apoenzyme (MONOD, 1947). L'adaptation enzymatique a été étudiée surtout chez les microorganismes, mais le travail récent de KNOX et MEHLER (1951) a mis en évidence un phénomène semblable dans le foie du rat. Parmi les substances inductrices, les plus étudiés jusqu'à présent ont été les polysaccharides, les oses et quelques produits de leur catabolisme, les acides aminés aromatiques, quelques acides gras, les pectines et la pénicilline.

Considérons maintenant ce que nous apporte l'étude de la formation des enzymes respiratoires chez la levure.

a) Nous pouvons écarter facilement les deux objections souvent faites contre l'existence d'un processus d' « adaptation enzymatique », à savoir : la sélection de mutants possédant les enzymes en question, et l'augmentation de la perméabilité vis-à-vis du substrat. Nous sommes à l'abri de la première objection du fait que la formation des enzymes respiratoires peut être observée sur des cellules non-proliférantes. D'un autre côté, la mesure directe de la teneur des cytochromes par spectroscopie et le titrage des activités enzymatiques après extraction nous mettent à l'abri de la deuxième critique.

b) Comme cela est exigé par la définition même de l'adaptation enzymatique, dans le cas étudié ici, c'est le substrat (O_2) qui induit la synthèse des enzymes déterminant la vitesse de son métabolisme.

c) On sait que l' « adaptation enzymatique » exige, comme toutes les synthèses, un apport d'énergie utilisable (inhibition par le dinitrophénol, MONOD, 1944 ; inhibition par le $Na\ N_3$, SPIEGELMAN, *l. c.*). Dans notre cas, cette relation est très nette. La levure normale synthétise le cytochrome *c* même en absence d'une source exogène d'énergie ; l'addition du glucose ne fait qu'accélérer le processus. Le mutant « petite colonie » n'est capable de former le cytochrome *c* qu'en présence du glucose exogène. Ceci est compréhensible, car nous savons que les « grandes » peuvent métaboliser leurs réserves endogènes et, de ce fait, produire l'énergie nécessaire aux synthèses, tandis que le catabolisme endogène des « petites » est pratiquement nul (§ 3.23). La synthèse adaptative aux dépens du métabolisme endogène a été observée chez la levure dans le cas de la galactosylase (SPIEGELMAN et coll., 1947).

d) La formation des cytochromes diffère des adaptations enzymatiques précédemment décrites par une caractéristique importante. Toutes les données expérimentales indiquent que la cinétique de ces phénomènes suit une courbe en S où la vitesse de synthèse s'accroît pendant un certain temps (MONOD, 1947 ; SPIEGELMAN, 1951). Cette constatation a donné lieu à un certain nombre de spéculations concernant le mécanisme de ce processus. Elle était en particulier à la base du rejet par SPIEGELMAN (*l. c.*) de l'hypothèse de YUDKIN (1938) selon laquelle le substrat déplace l'équilibre entre l'enzyme et son précurseur, suivant la loi d'action de masse. La figure 43 donne la courbe de l'augmentation, en fonction du temps, de la teneur en cytochrome *c* d'une levure cultivée en anaérobiose puis aérée en présence de glucose. La courbe ressemble à une hyperbole à asymptote horizontale et non pas à une courbe autocatalytique en S. Sur la même figure est tracée en pointillé la courbe théorique,

calculée en admettant une cinétique de réaction du premier ordre $\bar{E} = \bar{p}(1 - e^{-kt})$, où $k = 0,45$; cette cinétique est en accord avec l'hypothèse de YUDKIN (l. c.). On voit que les deux courbes sont en très bon accord. Rien dans nos expériences ne s'oppose donc à ce que l'on conçoive la synthèse du cytochrome *c* comme une réaction du premier ordre. Remarquons cependant que les données expérimentales ne nous permettent pas de distinguer entre l'ordre 0 et l'ordre 1 dans la première partie de la courbe. Il serait important de vérifier si l'accroissement des autres enzymes respiratoires a la même allure. LANDMAN (1951) a récemment observé que la formation adaptative de la lactase chez *Neurospora* affectait aussi la forme d'une courbe hyperbolique et non pas celle d'une courbe en S.

e) Quel est le mécanisme de la formation des enzymes respiratoires, induite par l'oxygène ?

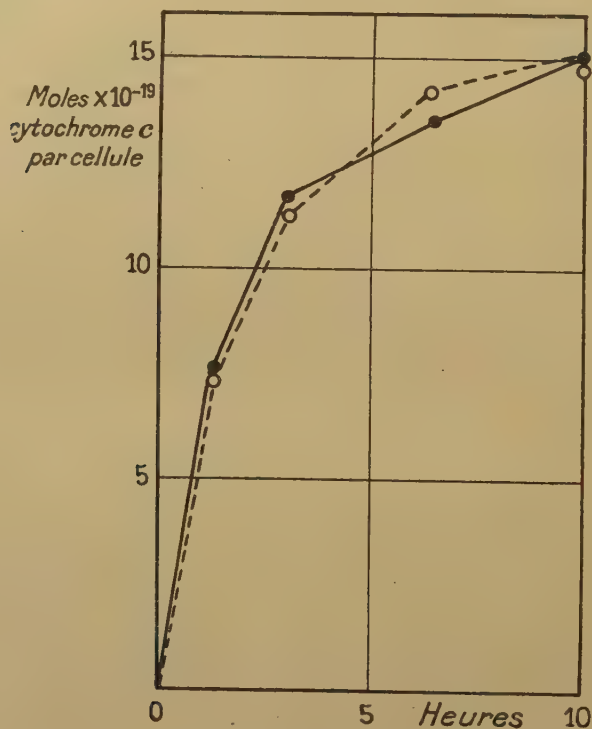


Fig. 43. — Accroissement de la teneur en cytochrome *c* pendant l'aération de la levure 59 R cultivée en anaérobiose.

Courbe expérimentale en trait plein ; courbe théorique en pointillé.

Examinons d'abord le problème de la formation des groupements prosthétiques et des protéines spécifiques des enzymes. Nous avons déjà rencontré page 118 et suivantes le même problème à propos de la comparaison des souches normales et mutantes cultivées en aérobiose. Il y a été conclu que la mutation avait pour effet primaire la suppression de la formation de la copule protéique et que l'anabolisme des hémines était affecté secondairement. La situation devant laquelle nous nous trouvons maintenant est encore plus complexe. La levure normale, cultivée en anaérobiose, possède environ trois à quatre fois moins de Fer protoporphyrinique (1 à $1,5 \mu$ g-atomes/g N) que la levure aérobie. Au cours de l'adaptation, la quantité d'hémines totales s'accroît d'abord très rapidement et atteint finalement des valeurs bien supérieures à celles nécessaires pour rendre compte des teneurs en cytochromes *b* et *c*. Pendant la croissance en absence d'air, on observe une excrétion des porphyrines libres, dont l'accumulation dans le milieu peut atteindre, dans certaines conditions, des valeurs élevées (1 à 2μ mole/g N). Enfin, aucun enzyme, dont on est certain que l'hème est le groupement prosthétique, n'a été décelé en quantité appréciable chez la levure anaérobie. Le tableau que l'on vient de décrire pourrait donc être dû à ce que le manque d'oxygène bloque la biosynthèse des hémines sans toucher directement à celle des porphyrines. Si ces biosynthèses s'effectuent à partir de précurseurs communs (par ex. résidus en C_2 ou en C_3 , provenant du catabolisme glucidique), on comprend aisément l'excrétion des porphyrines éthérosolubles qui a lieu en anaérobiose.

Cependant, certaines observations nous font penser que l'effet primaire de l'oxygène ne concerne pas l'anabolisme héminique :

- α) l'amplitude des variations de la teneur en enzymes hémoprotéiques est d'un ordre de grandeur tout à fait différent (cytochrome *c* $> 50 \times$, cytochrome-oxydase $> 200 \times$, lactate $\rightarrow$ cyt. *c* $> 200 \times$, succinate $\rightarrow$ cyt. *c* $> 50 \times$, etc., voir § 4.3) de celui des variations de la teneur en hémines (3-4 fois) ;
- β) la levure anaérobie normale, bien que dépourvue des cytochromes *b* et *c*, contient une quantité de protohème suffisante pour la formation de ces deux hémoprotéines principales, et le cytochrome *a* est remplacé par le cytochrome a_1 qui a une position spectroscopique voisine de l'hémochromogène pyridinique *a*. Enfin,
- γ) chez 59 RA, la quantité de protohème est sensiblement la même quelle que soit l'atmosphère. Or, si le manque d'oxygène bloquait la synthèse des hémines, on devrait trouver des différences considérables au cours de l'aération d'une « petite » anaérobie. Il nous paraît donc beaucoup plus probable que l'oxygène

intervient dans le tout dernier chaînon de la biosynthèse des cytochromes, soit en induisant la formation des protéines spécifiques, soit en rétablissant la possibilité de liaison entre les apoenzymes et les groupements prosthétiques. Les modifications du métabolisme des tétrapyrroles seraient l'effet et non la cause des variations de la teneur en hémoprotéines. Les changements phénotypiques s'effectueraient donc selon un mécanisme semblable à celui des changements héréditaires, à ceci près que les deux mécanismes porteraient sur des ensembles de protéines différentes. Cette interprétation de la synthèse adaptative des cytochromes n'est pas en contradiction avec le fait qu'elle peut avoir lieu en absence d'une source exogène d'azote. On sait, en effet, que la levure contient généralement une certaine réserve azotée, et l'adaptation enzymatique sans source exogène d'azote a été constatée par SPIEGELMAN (1945) chez la levure et par STANIER (1947) chez *Pseudomonas*. Il reste cependant à savoir pour quelles raisons les « petites » n'excrètent pas de porphyrines en aérobiose, alors que leur teneur en hémines est diminuée par comparaison avec celle des « grandes ».

Remarquons enfin que les variations phénotypiques observées chez *B. cereus* sont tout à fait analogues à celles que l'on vient de décrire chez la levure : les bactéries cultivées en aérobiose possèdent environ $1,8 \mu$ mole d'hémines (protohème + cyt. *c*)/g N alors que les bactéries anaérobies n'en contiennent qu'environ $0,3 \mu$ mole et que les porphyrines s'accumulent en anaérobiose dans le milieu jusqu'à une teneur de 5μ moles/g N (SCHAEFFER, 1950 ; SCHAEFFER et SLONIMSKI, 1951).

f) Si l'on admet ce point de vue qui met l'accent, dans l'interprétation de l'adaptation à l'oxygène, sur la copule protéique, le problème de la nature des précurseurs des apoenzymes respiratoires se pose. Il est clair que, si l'unique moyen de mesure est la détermination de l'activité enzymatique, les relations entre précurseurs et enzymes sont inabordables. Nos expériences présentent, par rapport à la plupart des expériences décrites, l'avantage de reposer sur l'étude du spectre d'absorption. COHN et TORRIANI (1951), dans un cas analogue au nôtre, ont récemment introduit une autre méthode qui permet de suivre, à l'aide des techniques immunochimiques, les relations de filiations entre deux protéines.

Considérons la fig. 33. La large bande à $557-9 m\mu$ visible dans la levure cultivée en anaérobiose, que nous avons assimilée au cytochrome b_1 ⁽¹⁾ se déplace à $554 m\mu$ à -170° et ne se scinde pas. Elle

(1) Comme il a été souligné auparavant (cf. Tableau XIV), le terme « cytochrome b_1 » correspond à des substances différentes selon le matériel biologique étudié.

ne comporte pas le constituant α c , est thermolabile et correspond vraisemblablement à un composé dont le groupement prosthétique est le protohème. Etant donné, d'une part, que dans le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose, le cytochrome b_1 remplace les cytochromes b et c et, d'autre part, qu'il disparaît pendant l'aération au fur et à mesure de la formation de ces constituants, il est tentant, à première vue, de le considérer comme précurseur de b et de c . Cependant, la mutation « petite colonie » qui interdit la formation du cytochrome b , ne fait pas apparaître le cytochrome b_1 . Il nous paraît donc plus vraisemblable que cet hémochromogène natif (bande α à 557-9 m μ) est le précurseur du cytochrome c seul (¹).

En quoi pourrait consister la transformation $b_1 \rightarrow c$? Le groupement prosthétique c est ancré dans la protéine d'une façon très particulière, qui lui confère une stabilité exceptionnelle (cf. THEORELL, 1947). On peut penser que la transformation $b_1 \rightarrow c$, induite par l'oxygène, consiste justement dans l'établissement des liaisons du type thioether entre la cystéine de la protéine c et les radicaux vinyl du protohème dérivé du cytochrome b_1 . La bande visible à -170° (que nous appellerons b_4) et située à 555 m μ (fig. 33) pourrait être l'image d'une forme intermédiaire entre le « stade » b_1 et le « stade » c . Elle est thermostable (caractère réservé au cytochrome c et résultant vraisemblablement du type de liaison hème-protéine) et disparaît au fur et à mesure de l'apparition du cytochrome c . Son évolution est analogue chez le mutant qui ne forme que le cytochrome c , et, son apparition paraît dans certaines conditions, précéder celle du cytochrome c . Cette dernière observation était faite sur des levures qui ont cessé de croître en anaérobiose depuis une vingtaine d'heures. Au cours de l'aération dans le tampon glucosé, on constate dans une telle levure d'abord une bande b_1 intense et une bande b_4 plus faible ; ensuite la bande b_4 devient plus forte ; et finalement la faible bande du cytochrome c commence à être décelable à 546-7 m μ (-170°). Le schéma hypothétique serait donc : $b_1 \rightarrow b_4 \rightarrow c$. La relation entre les cytochromes a_1 et a pourrait être tout à fait analogue, le premier étant le précurseur du second.

Les constituants anormaux (b_1 , b_4 , a_1) représentent pour l'instant des événements spectroscopiques plutôt que des corps définis. Leur relation avec le cytochrome c , par exemple, n'est pas connue et il en est de même de leur fonction physiologique. Nous allons voir ce

(¹) Dans une publication (EPHRUSSI et SLONIMSKI, 1950) nous avons considéré le cytochrome b_1 comme précurseur des cytochromes b et c .

que nous apportent à ce propos les mesures de l'activité enzymatique.

g) Le fait le plus marquant qui ressort de l'étude du rôle de l'oxygène dans le déterminisme de la constitution enzymatique est peut-être son effet « pléiotrope ». On a vu dans le paragraphe 4.3 que l'oxygène affecte la biosynthèse de plusieurs enzymes. Cette constatation peut être interprétée de deux manières différentes. Selon le point de vue adopté, le mécanisme responsable des variations simultanées des enzymes reposerait principalement soit sur leur *parenté d'origine*, soit sur leur *parenté de fonction*. Avant d'aborder ce problème, il est important de préciser le nombre d'entités chimiques distinctes sur lesquelles porte cet effet pléiotrope ⁽¹⁾. Il est de sept au moins ⁽²⁾ : cytochrome-oxydase (cytochromes *a*, *a*₃) ; lactico-cytochrome *c*-réductase (cytochrome *b*₂, lactico-BM-réductase) ; succinate-cyt. *c*-réductase (cytochrome *b*, succino-BM-réductase) ; α glycérophosphate-cyt. *c*-réductase (α glycérophosphate-BM-réductase) ; cytochrome *c* ; malico déshydrogénase ; alcool déshydrogénase. Les preuves que dans chacun de ces cas il s'agit d'entités distinctes sont fournies soit par la possibilité de la séparation complète (par ex. lactico-cytochrome *c*-réductase $\neq$ cytochrome-oxydase, § 3.36), soit par des différences de structure (cytochrome *b* $\neq$ cytochrome *a* $\neq$ cytochrome *c*), soit enfin par des différences dans la vitesse de la synthèse adaptative (α glycérophosphate-cytochrome *c*-réductase $\neq$ succino-cytochrome *c*-réductase, v. tableau XXXVIII).

Envisageons la première hypothèse. La parenté d'origine peut être imaginée le plus simplement de la façon suivante : les sept enzymes sont formés à partir d'un précurseur commun (P), dont la formation est déclanchée par l'oxygène (schéma 1 de la fig. 44). Cette interprétation doit être éliminée puisqu'elle implique un parallé-

(1) Il ressort des descriptions des systèmes enzymatiques étudiés dans ce travail (v. § 3.34 et 3.35) que l'absence simultanée du cyt. *b* et des systèmes succinate $\rightarrow$ cyt. *c* et succinate $\rightarrow$ BM, p. ex., peut être due à l'absence d'une même substance. Nous expliciterons cette situation par la notation suivante : succino-cyt. *c* réductase (cytochrome *b*, succino-BM réductase).

(2) Nous ne comptons pas ici le système $\text{CoI H}_2 \rightarrow$ cyt. *c* comme une entité séparée car : a) dans le muscle cardiaque un chaînon de ce système intervient également dans le système succinate $\rightarrow$ cyt. *c*. (v. § 3.352) ; b) dans nos expériences les variations de ce système sont identiques à celles de la succino-cyt. *c* réductase : absence totale chez la « petite », disparition et formation parallèle en fonction de l'aération chez la « grande ». Il nous paraît donc hautement vraisemblable que chez la levure le même facteur limite la réduction du cyt. *c* par le CoI H_2 et par le succinate. Etant donné que la vitesse absolue de la réaction $\text{CoI H}_2 \rightarrow$ cyt. *c* est environ 10 fois plus grande on pourrait conclure que l'affinité de ce facteur pour la diaphorase est plus grande que pour la déshydrogénase succinique.

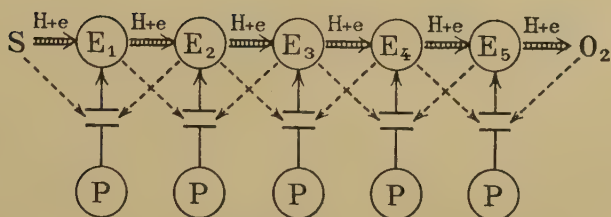
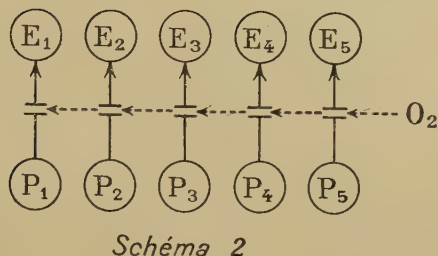
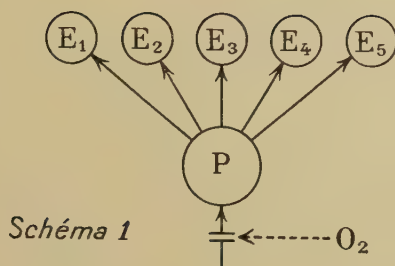


Fig. 44. — Induction par l'oxygène de la biosynthèse des enzymes respiratoires.

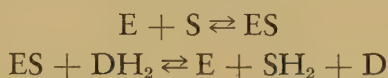
lisme strict dans les variations des enzymes E_1 à E_7 . Or, l'expérience montre que ce n'est pas le cas.

On peut supposer une relation de filiation analogue, mais dans laquelle l'oxygène intervient au niveau de la formation de chaque enzyme (schéma 2, fig. 44). Autrement dit, l'action de l'oxygène serait dépourvue de toute spécificité, celle-ci étant conférée par d'autres facteurs, et le rôle de l' O_2 se limiterait à rendre possible la transformation des précurseurs spécifiques des sept enzymes. Cette manière de voir n'est guère satisfaisante car elle recule simplement le problème de l'origine de la spécificité enzymatique à un niveau différent, celui des précurseurs. Comme modèle de ce type d'action de l'oxygène on peut prendre l'établissement d'un certain potentiel d'oxydoréduction ou l'oxydation directe des précurseurs autoxy-

dables $P_1 \dots P_7$. Nous ne pouvons pas écarter cette hypothèse. Elle nous semble cependant assez peu vraisemblable, car les expériences dans lesquelles nous avons essayé d'induire la synthèse des cytochromes en élevant le potentiel d'oxydo-réduction en anaérobiose ont donné des résultats négatifs. Nous avons utilisé le bleu de méthylène M/300 (E'_0 à pH 5,6 = 0,066 v), le 1-naphtol-2-sulfonate-sodium-indo-2,6-dichlorophenol M/300 (E'_0 à pH 5,6 = 0,233 v), le ferricyanure de K M/30 et M/300 (E'_0 à pH 5,6 = 0,430 v) et le nitrate de K M/30 et M/300. Il serait intéressant d'étendre cette étude à des oxydants plus physiologiques (par ex. le glutathion) et de suivre leur action non seulement par l'étude du spectre, mais aussi par des tests d'activité enzymatique.

C'est cependant une hypothèse fondée sur une parenté fonctionnelle des enzymes qui nous paraît plus séduisante. Les enzymes E_1 à E_7 représentent les médiateurs successifs du transfert d'hydrogène et d'électrons à l'oxygène et il existe une certaine corrélation entre la position qu'un enzyme donné occupe dans la chaîne des oxydo-réductions et l'amplitude de ses variations au cours de la perte et de l'acquisition des enzymes (comparer les tableaux XXXIII, XXXVIII, à la fig. 9) : l'enzyme qui réagit directement avec l'oxygène présente la plasticité la plus marquée, ceux du début du système respiratoire, la plasticité la plus faible (malate $\rightarrow$ Co I), tandis que l'alcool déshydrogénase, dont la participation dans le métabolisme anoxybiontique est bien établie, présente des variations dans le sens inverse. Selon cette hypothèse, l'oxygène induirait la synthèse d'un seul enzyme qui, à son tour, influencerait la formation de l'enzyme suivant, et ainsi de suite (schéma 3 de la fig. 44). Il en découle que l'action de l'oxygène serait spécifique seulement pour la réaction $P_7 \rightarrow E_7$ tandis que dans la réaction suivante, $P_6 \rightarrow E_6$, c'est l'enzyme E_7 qui jouerait le rôle d'inducteur. STANIER (1947), SUDA et coll. (1950) et COHEN (1950-51) ont élaboré une théorie de l'adaptation « simultanée » qui s'est révélée très fructueuse dans l'étude du métabolisme bactérien du tryptophane et des glucides. L'idée principale de ces auteurs est la suivante : si la dégradation d'un corps A s'effectue par les étapes intermédiaires A_1, A_2, A_3 , catalysées par les enzymes E_1, E_2, E_3 , l'adaptation à la substance A fait apparaître tous les enzymes successifs, tandis que l'adaptation à la substance A_3 ne fait apparaître que les enzymes E_3, E_4 . Autrement dit, chaque substrat intermédiaire induit la biosynthèse de l'enzyme correspondant. Le schéma que nous venons de proposer est analogue à la conception de l'adaptation simultanée avec cependant une différence essentielle. Nous

avons affaire à des enzymes de transfert et, dans ce cas, la notion de substrat n'est pas aussi simple que pour les enzymes hydrolytiques par exemple. En effet, la cytochrome-oxydase a un substrat typique qu'elle active, l'oxygène, et un donateur dont la spécificité est absolue, le cytochrome *c*. Dans le cas le mieux étudié, celui de la Co II H₂-cytochrome *c*-réductase, la protéine spécifique de l'enzyme est en équilibre avec trois corps différents et spécifiques : alloxazine mono-nucléotide, cytochrome *c* et TPN (HAAS et coll., 1940, 1942) (v. p. 108). La distinction entre groupement prosthétique, coenzyme et substrat devient quantitative et fondée uniquement sur la valeur des constantes de dissociation (cf. WURMSER, 1949 ; DIXON, 1949). CHANCE (1951) a étudié en détail les réactions catalasiques et peroxydasiques. Leurs mécanisme comporte deux réactions bimoléculaires consécutives :



et les affinités de l'enzyme pour différents substrats et donateurs d'hydrogène ont pu être mesurées directement. Devant une telle situation, il nous paraît plus probable que la biosynthèse d'un enzyme E_n , faisant partie d'une chaîne de transfert, est déterminée par la *présence simultanée des deux corps, donateur et accepteur, assurant le transfert*. « L'adaptation simultanée » des auteurs cités devient « l'adaptation des systèmes multi-enzymatiques ». L'hypothèse d'une corrélation entre formation d'un enzyme de transfert et possibilité de son fonctionnement présente certains avantages.

α) Elle rend compte des modifications graduelles de la constitution enzymatique de la levure normale, car les variations les plus grandes sont observées pour des chaînons qui ne peuvent pas fonctionner en anaérobiose, les variations faibles pour ceux qui peuvent continuer le transfert d'H même en absence d'O₂ (l'oxydation du malate *via* Co I peut être couplée avec la réduction d'un autre accepteur que le cytochrome *c*) et les variations inverses pour l'enzyme (alcool → Co I) dont la participation dans le métabolisme anaérobie est plus importante que celle dans le métabolisme aérobie ;

β) Elle implique des variations concomitantes des coenzymes et des groupes prosthétiques d'une part, et des apoenzymes de l'autre. Or, on a vu plus haut que le métabolisme des hémimes est influencé par l'oxygène, et ZETTERSTROM et coll. (1951) ont trouvé que l'aération d'une levure anaérobie est accompagnée d'une synthèse rapide du Co I, dont la cinétique suit une courbe hyperbolique analogue à celle que nous avons trouvée pour la synthèse du cyto-

chrome *c*. Ce résultat est interprété comme une conséquence de la formation adaptative des enzymes dans le passage anaérobiose → aérobie. γ) Elle rend compte des variations de la teneur en déshydrogénase malique et en alcool-déshydrogénase dues à la mutation « petite colonie » en tant que conséquence de la perte de la cytochrome-oxydase. δ) Sa valeur peut être vérifiée par une expérience directe. En effet, la biosynthèse de la lactico-cytochrome *c*-réductase, par exemple, devrait pouvoir être induite en anaérobiose par la présence simultanée du cytochrome *c* oxydé et du lactate, mais non par ces deux corps séparément. ε) Les systèmes enzymatiques aboutissant aux cytochromes, autres que ceux étudiés ici, doivent aussi disparaître en anaérobiose et doivent pouvoir être induits par l'oxygène. A ce sujet, il faut noter que COHEN (1949-1950) a mis en évidence l'adaptation des enzymes du système WARBURG-CHRISTIAN-DICKENS à leurs donateurs d'hydrogène et que GALE a observé la disparition d'un certain nombre de désaminases oxydatives au cours de la culture anaérobie d'*E. coli*. De tels systèmes peuvent constituer un matériel favorable pour la vérification de notre hypothèse. Il serait intéressant aussi de savoir si les enzymes qui assurent le couplage des phosphorylations avec l'oxydation des coenzymes pyridiniques par le cytochrome *c* (SLATER, 1951 ; LEHNINGER, 1951) sont également affectés. Le métabolisme de la tyramine fournit un exemple qui peut relever de l'induction bilatérale que nous venons de suggérer. GALE (1942) a constaté que des bactéries (*E. coli* et *Pseudomonas pyocyanea*) cultivées en absence de tyramine et en présence d'air, ou en présence de tyramine et en anaérobiose, présentent un temps de latence dans l'attaque de cette amine, alors qu'après culture en présence d'air et de tyramine, elles l'oxydent immédiatement.

L'adoption de l'hypothèse selon laquelle l'oxygène n'induit que la formation de l'enzyme qui l'active, et qui à son tour induit la biosynthèse de l'enzyme suivant, se heurte à deux difficultés. α) Elle n'explique pas la formation du cytochrome *c* (non autooxydable dans les conditions physiologiques) au cours de l'aération du mutant « petite colonie », dépourvu de cytochrome-oxydase. A moins que l'on trouve chez ce mutant un enzyme oxydant le cytochrome *c* (cytochrome *c*-peroxydase, p. ex.), il faut admettre que, dans ce cas, l'oxygène agit en tant qu'oxydant (schéma 2 de la fig. 44) et non pas en tant que substrat. β) On comprend mal la différence entre l'ampleur de la biosynthèse des cytochromes *c* et *b* d'une part, et l'ampleur de la biosynthèse des systèmes enzymatiques tels que lactate → cytochrome *c*, succinate → cytochrome *c*, Co I H₂

→ cytochrome *c* d'autre part. Déjà après 4 à 6 heures d'adaptation de 59 R qui a proliféré en anaérobiose, la teneur en cytochromes *c* et *b* atteint les valeurs caractéristiques de la levure ayant proliféré en aérobiose. La vitesse initiale de l'accroissement de la teneur en cytochrome *c* pendant l'aération dans le tampon glucosé ($2,4 \times 10^{-5}$ mg Fe/mg N/heure) est tout à fait comparable à celle observée au cours de la croissance exponentielle en aérobiose ($2,8$ à $3,5 \times 10^{-5}$ mg Fe/mg N/heure). Le rapport entre la vitesse de la respiration des cellules intactes et leur teneur en cytochrome *c*, c'est-à-dire le « nombre de rotations » du cytochrome *c*, reste sensiblement constant au cours de l'adaptation (dans l'expérience du tableau XXXV, sa valeur est comprise entre 800 et 1200 à 28°). Ce fait montre soit que le cytochrome *c* est le facteur limitant la vitesse de la respiration globale, soit que le vrai facteur limitant est synthétisé avec la même vitesse que le cytochrome *c*. Il est intéressant de rappeler que, d'après WARBURG (1948), l'oxydation du ferrocytochrome *c* par la ferrioxydase représente le chaînon le plus lent de la chaîne respiratoire. Cependant, les activités des réactions lactate → cytochrome *c*, succinate → cytochrome *c*, Co I H_2 → cytochrome *c* n'atteignent, au cours des six premières heures de l'adaptation, que des valeurs bien inférieures à celles qui caractérisent la levure ayant proliféré en présence d'oxygène. Même après 23 heures d'aération dans le tampon glucosé, les teneurs en ces enzymes sont environ quatre fois inférieures aux valeurs correspondantes chez la levure aérobie. Il serait intéressant de savoir si l'addition d'une source exogène d'azote ou de facteurs de croissance accroissent l'ampleur de la formation des déshydrogénases. On connaît en effet, l'effet stimulateur de l'azote exogène (SPIEGELMAN, 1950), et BLANCHARD et coll. (1950) ont montré que la formation adaptative de l'enzyme malique requiert la présence de la biotine.

4. Quelle est la portée des phénomènes que nous venons de décrire ? On se souvient que *B. cereus* (mais non *E. coli*) se comporte d'une manière analogue à la levure quant à la perte des cytochromes en anaérobiose (SCHAEFFER, 1950). Il serait intéressant de savoir si un parallélisme existe aussi quant aux activités métaboliques et enzymatiques. CHIN (1950) a obtenu certains résultats similaires à ceux relatés plus haut : au cours de l'aération d'une levure de brasserie, une bande centrée à 558 m μ disparaît et les cytochromes *c* et *b* apparaissent ; il en est de même pour les cytochromes *a*₁ et *a*. En outre, il a montré que la transformation *b*₁ → *c* est réversible même en absence de prolifération à condition que l'on parte de cellules qui ne sont pas complètement adaptées. Ceci corrobore

nos résultats discutés page 137. La seule différence importante entre les résultats de CHIN (*l. c.*) et les nôtres, réside dans le fait que la bande à 558 m μ qu'il a observée se scinde à -170° en donnant en particulier la bande αc . Il nous paraît probable que cette différence est due à ce que CHIN n'a pas pris de précautions spéciales afin d'assurer l'anaérobiose stricte des cultures pendant la prolifération. En effet, les propriétés de la bande à 558 m μ qu'il trouve correspondent à celles que nous observons chez des levures qui prolifèrent en anaérobiose partielle (cf. tableau XXXV) et chez des levures qui, après avoir proliféré en anaérobiose stricte, sont aérées pendant un temps court (2 h., cf. tableau XXXVII). La justesse de cette interprétation est confirmée par le fait que le Q_{O_2} des levures de CHIN est élevé dès le début des expériences d'aération.

Les observations de EGAMI et SATO (1947-1950) et de POLLOCK (1946) peuvent servir de point de départ pour l'étude de la formation adaptative d'un système cytochromique autre que le système WARBURG-KEILIN. Les auteurs japonais pensent que le cytochrome b_1 d'*E. coli*, différent du cytochrome b_1 de la levure, joue le rôle d'intermédiaire dans le transfert d'hydrogène au nitrate. Or, d'après POLLOCK (1946) la nitratase est un enzyme adaptatif.

5. Les variations de la constitution enzymatique de la levure nous amènent à reconsidérer un des problèmes centraux de la biochimie et de la physiologie cellulaire moderne, l'effet Pasteur. La discussion des très nombreuses recherches liées à cette question sort du cadre de notre travail. L'importante littérature accumulée au cours des trois dernières décades est résumée dans plusieurs mises au point dont les plus récentes sont celles de DIXON, 1937 ; BURK, 1939 ; LIPMANN, 1942 ; BARRON, 1943 ; ENGELHARDT, 1946 ; DICKENS, 1951. Comme ces auteurs l'ont souligné à plusieurs reprises, la définition même de l'effet Pasteur, ainsi que ses prémisses, sont employées très souvent avec des significations différentes. Il est donc nécessaire de définir d'abord clairement ce qu'on entend par ce terme et ceci est impossible sans s'adresser aux travaux originaux de PASTEUR.

Après avoir constaté que la multiplication des microorganismes est possible à l'abri de l'air, PASTEUR a mesuré le rapport entre le poids de levure obtenue au cours de la prolifération et le sucre consommé. Il a trouvé que, pour une même quantité de matière vivante formée, il faut beaucoup plus de sucre en anaérobiose qu'en aérobiose (5 à 40 fois, selon les conditions). Il n'a pas hésité à fonder son interprétation de ce phénomène sur des considérations thermodynamiques : la quantité d'énergie libérée par la dégradation fer-

mentaire étant beaucoup plus petite, il faut plus de substrat pour effectuer la synthèse de la même masse de protoplasme ⁽¹⁾. Implicitement, il a reconnu que « fournit-on à celle-ci (la levure) une quantité d'oxygène libre aussi grande que l'exigent sa vie, sa nutrition, les combustions respiratoires... elle cesse d'être ferment, c'est-à-dire que le rapport du poids de la plante au poids du sucre qui est son principal aliment carboné est du même ordre que pour les moisissures » (*l. c.* p. 203). Il est nécessaire de souligner que ce qui comptait pour PASTEUR était le « pouvoir du ferment » et non pas la vitesse fermentaire : « ... le pouvoir d'un ferment est indépendant du temps pendant lequel il s'exerce » (*l. c.* p. 200) ; « ... sa puissance fermentescible (puissance qu'il ne faut pas confondre avec l'activité fermentescible ou l'intensité de la décomposition dans un temps donné)... » (*l. c.* p. 203) ; cf. aussi la discussion avec SCHÜTZENBERGER (*l. c.* p. 199).

Depuis les travaux classiques de MEYERHOF (1925) sur la respiration et la fermentation de la levure et du muscle, et depuis l'introduction du terme « effet Pasteur » ⁽²⁾, le centre de gravité du problème s'est déplacé. L'accent est dorénavant sur les vitesses des réactions, et la majorité des expériences porte sur le métabolisme des cellules non proliférantes. Comme nous verrons plus loin, ce changement a limité le problème qui, dans son *sens large*, devrait être compris comme « la totalité des effets que l'aérobiose exerce sur les processus du métabolisme anoxybiotique » (ENGELHARDT, 1946). Au *sens restreint*, l'effet Pasteur est le plus souvent défini comme l'inhibition, par l'oxygène libre, des processus fermentaires, ces der-

(1) Le raisonnement de Pasteur était fondé sur l'hypothèse que le même facteur limite la croissance de la levure en aérobiose et en anaérobiose, à savoir, la source d'énergie (sucre). La même hypothèse était implicitement admise par tous les auteurs des mises au point citées plus haut. Or, nous savons (cf. § 4.2) que la croissance en anaérobiose est souvent limitée par des facteurs autres que la quantité de glucose. Dans ce cas, le rapport $r = \text{poids de levure formée} / \text{sucre consommé}$ ne dépend nullement du rendement énergétique des processus oxybiontique et anoxybiontique. Il est même hautement vraisemblable que certaines expériences de PASTEUR étaient effectuées dans ces conditions. En effet, le maximum théorique d'énergie libérée par la combustion du glucose est de 686 kg cal./mole, alors que, par fermentation, il est de 54 kg cal./mole. L'efficacité, c'est-à-dire le rapport entre l'énergie utilisable par la cellule et l'énergie libérée, de ces deux réactions, est, d'après LIPMANN (1943), du même ordre de grandeur, les fractions transférées aux liaisons de phosphate fortes étant analogues dans les deux cas. Il en résulte que 1/12 à 1/9 de l'énergie totale disponible est fourni par le processus fermentaire, ce qui signifie que le rendement réel de la croissance en anaérobiose ne peut pas être inférieur à une dizaine de fois de celui de la croissance en présence d'oxygène, si les prémisses ci-dessus sont justes. Or, Pasteur a trouvé des rapports r 44 fois plus faibles en anaérobiose qu'en aérobiose.

(2) Ou, plus exactement réaction de Pasteur : « Respiration et fermentation sont donc liées par une réaction chimique, que je nomme, d'après celui qui l'a découverte, « Réaction de Pasteur » (WARBURG, 1928).

niers étant mesurés généralement par l'accumulation des produits finaux (BURK, 1939). Nous allons prendre cette définition comme point de départ de la discussion.

a) Les mutants « petite colonie » ne montrent pas d'effet Pasteur. On a vu, en effet, page 33, que la fermentation des « petites » présente des valeurs très voisines en absence et en présence d'air, quel que soit le mode de culture préalable. L'oxygène n'inhibe donc pas sensiblement (tout au plus de 5 %) la vitesse du dégagement du CO_2 , alors que chez les souches normales l'inhibition est très marquée ($Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2} - Q_{\text{CO}_2}^{\text{air}} = 150$ à 250 , ce qui peut représenter 90 % de la valeur dans l'azote), bien que les vitesses de fermentation anaérobie soient sensiblement les mêmes dans les deux races. Cependant, il faut remarquer qu'il existe une différence significative, quoique très petite, entre le $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ et le $Q_{\text{CO}_2}^{\text{air}}$ chez le mutant. En raison de sa faiblesse, il n'est pas possible de la mesurer avec beaucoup de précision, mais, en prenant la moyenne de plusieurs déterminations indépendantes, nous avons estimé sa valeur qui est comprise entre 5 et 15. Cette constatation peut conduire à une interprétation assez paradoxale. Un des moyens les plus utilisés pour exprimer quantitativement l'intensité de l'effet Pasteur est le quotient oxydatif de MEYERHOF (QOM) : $(Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2} - Q_{\text{CO}_2}^{\text{air}}) \times 3/Q_{\text{O}_2}$. Il exprime le nombre de molécules de glucose dont la dégradation fermentaire a été empêchée par la respiration d'une molécule de glucose. Le QOM est une valeur expérimentale qui n'implique aucune interprétation quant au mécanisme de l'effet Pasteur, et LIPMANN (1942), qui a souligné la signification « économique » du QOM, a proposé de l'appeler *quotient de remplacement*. Les valeurs du QOM pour les deux races, « grande » et « petite », cultivées en boîtes de Petri en aérobiose et fondées sur les moyennes de 5 déterminations indépendantes sont :

$$59 \text{ R } \frac{(210 - 15) \times 3}{82} = 7,1 \quad 59 \text{ RA } \frac{(251 - 238) \times 3}{3,4} = 11,5$$

On voit que le QOM des mutants est plus élevé que celui des souches normales. Le même résultat peut être retrouvé en analysant les chiffres de STIER et CASTOR (1941) relatifs à la souche de levure obtenue par la culture en présence de KCN, souche qui présente des caractéristiques analogues à celles de nos « petites » : la souche parentale fournit un $\text{QOM} = 3,4$, tandis que, chez le mutant, il est de 6,7. Les données publiées par MEYERHOF (1925) contiennent des exemples analogues. C'est ainsi que *Torula*, qui présente la plus grande intensité respiratoire et le plus grand effet Pasteur (90-95 %

d'inhibition de la fermentation anaérobie par l'O₂), fournit un QOM = 3,6 à 4,4, alors qu'il est facile de rencontrer, parmi les levures de bière basses à faible respiration et forte fermentation aérobie, des QOM = 10. Si l'on se fondait uniquement sur la comparaison des QOM, on serait obligé de conclure que nos levures « petites », celle de STIER et CASTOR (1941) et les levures de brasserie basses présentent un effet Pasteur plus grand, car l'efficacité de leur respiration, dans la suppression de la dégradation anaérobie, est supérieure à l'efficacité de la respiration des souches dont elles dérivent. Cette situation paradoxale résulte du fait que le QOM décrit une relation entre le degré d'inhibition de la glycolyse et la respiration, et non pas entre la glycolyse et l'oxygène *per se*. Autrement dit, elle est une conséquence de la définition de l'effet Pasteur telle qu'elle a été formulée par WARBURG (1928). Nous avons souligné la différence entre ces deux points de vue parce que CASTOR (1939), dans un cas absolument identique à celui de nos « petites » ($Q_{CO_2}^{air \text{ ferm.}} = 96 \% Q_{CO_2}^{N_2}$), a conclu à l'existence d'un effet Pasteur considérable, et parce que plusieurs auteurs utilisent la mesure du QOM comme seul critère de ce phénomène (MEYERHOF et IWASAKI, 1930 ; MEYERHOF et FIALA, 1950).

Quelle est la cause de l'absence de l'effet Pasteur chez les mutants ? Chez la levure normale, le mécanisme de la réorientation du métabolisme glucidique en présence de l'O₂ n'est pas connu en détail et plusieurs interprétations ont été avancées pour l'expliquer. Il est même très vraisemblable que plusieurs mécanismes distincts opèrent selon les conditions expérimentales, car les deux systèmes, fermentaire et respiratoire, sont intégrés de façon complexe et l'oxygène peut intervenir en plusieurs endroits (BURK, 1939 ; BARRON, 1943). Un de ces mécanismes a été particulièrement discuté. Il est probable qu'il représente le mécanisme opérant dans les conditions physiologiques quand il s'agit de la levure, puisqu'il est le premier à intervenir dans la chaîne de la dégradation du glucose. WURMSER (1930) a suggéré que l'inhibition de la fermentation est due à l'oxydation d'un enzyme glycolytique résultant de l'élévation du potentiel d'oxydoréduction intracellulaire. Cette hypothèse fut confirmée par HOOGERHEIDE (1935) qui a montré que l'élévation de ce potentiel, obtenue par addition d'indicateurs d'oxydoréduction, inhibe, en absence d'O₂, la fermentation des cellules de levure intactes. LIPMANN (1933-34) a réussi à obtenir le même effet en absence de structure, en ajoutant au jus de Lebedeff des indophénols, qui à l'état oxydé inactivent réversiblement l'enzyme glycolytique. La nature de cet enzyme, point d'attaque du haut niveau d'oxydoré-

duction ($> 0,18$ v) a été élucidée par ENGELHARDT et coll. (1943-1946). Il s'agit de la phosphophérase qui catalyse la deuxième phosphorylation de l'hexose en transformant l' α -fructofuranose-6-phosphate (ester de NEUBERG) en α -fructofuranose-1 : 6-diphosphate (ester de HARDEN et YOUNG). C'est ainsi que la molécule du sucre, au lieu d'être scindée dichotomiquement par la fermentation, peut être dégradée apotomiquement par la respiration, selon la voie de WARBURG-CHRISTIAN-DICKENS. Le système électroactif naturel, responsable de l'inactivation de la phosphophérase, n'est pas connu avec certitude. ENGELHARDT (1946) signale deux possibilités : α) le système WARBURG-KEILIN fonctionne à la fois comme médiateur dans l'inhibition de la glycolyse et comme transporteur d'électrons et d'hydrogène dans la respiration ; β) « l'enzyme PASTEUR » est un système autoxydable distinct du système respiratoire. Il est clair que, si la première hypothèse était exacte, l'absence de cytochrome oxydase devrait conduire au blocage simultané de l'effet Pasteur et de la respiration. Selon la deuxième hypothèse, ces deux processus devraient, au contraire, pouvoir être bloqués indépendamment l'un de l'autre. Plusieurs expériences tendent à montrer que les deux systèmes sont distincts, mais les faits ne peuvent être considérés comme concluants. WARBURG (1928) a trouvé que l'isocyanure d'éthyle inhibe sélectivement l'effet Pasteur, sans toucher à la respiration. Un résultat analogue a été obtenu avec le CO dans le cas de la rétine par LASER (1937), avec le glutathion chez la levure (QUASTEL et WHEATLEY, 1932), et avec plusieurs colorants comme la phenosafranine dans les tissus animaux (DICKENS, 1936). STERN et MELNICK (1941) et MELNICK (1941), ont décrit, grâce à la méthode d'illumination introduite par WARBURG, les spectres d'absorption du complexe CO-facteur responsable de l'inhibition de la fermentation. Dans le muscle cardiaque, l'« enzyme Pasteur » montre une très grande ressemblance avec la cytochrome-oxydase, les bandes β et γ ayant une position identique, et les positions des bandes α ne différant que de 8 m μ environ. Chez la levure, l'analogie est encore plus grande, les spectres étant presque superposables. LASER (1937), KEMPNER (1939), et KEMPNER et GAFFRON (1939) pensent que l'enzyme Pasteur n'est pas identique aux catalyseurs de la respiration, car l'affinité de ces deux systèmes pour l'oxygène est différente. Chez les levures « petites » on constate l'abolition simultanée de la respiration et de l'effet Pasteur. Ces faits posent, d'une façon quelque peu différente, la question suivante : s'agit-il de la perte d'un seul ou de deux enzymes différents ? Bien que la première explication paraisse la plus simple, elle n'est pas la plus

vraisemblable, car on se souvient que les « petites » sont dépourvues d'au moins trois hémoprotéines distinctes : les cytochromes *a*, *b* et *c*, ainsi que de plusieurs autres systèmes enzymatiques dans lesquels la participation d'un constituant héminique est probable. Ceci montre l'existence d'un trouble profond dans la biosynthèse des hémoprotéines et l'absence d'une quatrième hémoprotéine ne serait donc pas surprenante.

b) Le problème se pose d'une manière identique pour la levure normale cultivée en anaérobiose. On constate qu'après prolifération en absence d'oxygène, les cellules ne montrent pas d'effet Pasteur, car les vitesses des fermentations anaérobie et aérobie du glucose sont sensiblement les mêmes (§ 4.31). Ceci est vrai uniquement pour la levure récemment séparée du milieu de culture car, au cours de l'aération ultérieure, elle acquiert le pouvoir d'orienter différemment son métabolisme, selon l'atmosphère dans laquelle elle se trouve, ce qui revient à dire que l'effet Pasteur fait son apparition. Celle-ci est accompagnée de la formation de toute une série d'enzymes (§ 4.32) et, comme dans le cas des « petites », rien ne permet d'affirmer à l'heure actuelle qu'elle soit l'effet direct de la biosynthèse des enzymes respiratoires et non un effet secondaire, car la possibilité de la synthèse simultanée d'un enzyme Pasteur distinct ne peut pas être écartée. Il est cependant intéressant de noter l'analogie entre les résultats obtenus *in vitro* par ENGELHARDT et SAKOW (1943) et ce qui se passe *in vivo* au cours de l'aération d'une culture anaérobie. Ces auteurs ont montré qu'en ajoutant du cytochrome *c* à un extrait de levure qui fermente le glucose, on ne déclenche pas l'effet Pasteur, tandis que l'addition simultanée du cytochrome *c* et de la cytochrome-oxydase provoque la suppression de la glycolyse aérobie. Quand on aère une suspension anaérobie de 59 RA, seul le cytochrome *c* est formé et la fermentation aérobie ne diminue pas au cours de l'expérience, alors que, lorsqu'on aère une culture anaérobie de 59 R, le cytochrome *c* et la cytochrome-oxydase apparaissent et l'effet Pasteur se déclenche.

c) Les paragraphes précédents ont mis en relief le double rôle de l'oxygène chez la levure : α) il diminue d'une façon réversible et non-progressive la vitesse de la fermentation ; β) il induit la synthèse des enzymes nécessaires pour que le phénomène α) puisse se produire. Ce deuxième rôle de l'oxygène a totalement échappé à l'observation des auteurs ayant travaillé sur l'effet Pasteur, parce qu'ils ont opéré dans des conditions où il était difficile de le mettre en évidence. En effet, lorsque l'on constate que l'oxygène modifie l'orientation du métabolisme glucidique (par exemple en mesurant la fermentation

d'une suspension non proliférante de levure de boulangerie du commerce en présence et en absence d'O₂), l'explication la plus simple est que seul le fonctionnement des enzymes est influencé. Ceci est vraisemblablement le cas dans les expériences de relativement courte durée et en absence de multiplication cellulaire dans lesquelles la vitesse de la formation des enzymes est négligeable par rapport à la vitesse avec laquelle ils agissent. Il en est tout autrement dans les conditions de la multiplication cellulaire ou au cours des expériences d'adaptation. Ici, le rôle primaire de l'O₂ est d'orienter les réactions qui aboutissent à la formation des enzymes. Dans le présent travail, nous avons montré que la présence ou l'absence de l'O₂ détermine la biosynthèse des enzymes respiratoires et des enzymes assurant la liaison entre le métabolisme oxybiontique et anoxybiontique. La formation des enzymes fermentatifs chez la levure (mais non leur fonctionnement) apparaît beaucoup moins influencée par la nature de l'atmosphère gazeuse. Le même aspect du problème est souligné dans le travail de FOWLER (1950) sur *E. coli*. Bien que ses expériences fournissent des données indirectes, fondées sur la seule étude de la croissance et du métabolisme global des cellules intactes, FOWLER conclut que l'air inhibe la synthèse des enzymes du système fermentaire, de sorte que les cellules qui passent de l'aérobiose à l'anaérobiose mettent un certain temps à s'adapter complètement. Le passage dans la direction inverse, de l'anaérobiose à l'air, ne nécessite apparemment pas d'adaptation. Cette dernière constatation est en accord avec les observations de GALE (1939) et de SCHAEFFER (1950) qui ont constaté que, chez *E. coli*, la croissance, même prolongée, en anaérobiose ne change pas l'aspect du spectre des cytochromes et n'est pas accompagnée d'excrétion des porphyrines comme c'est le cas chez la levure et chez *B. cereus* (SCHAEFFER, l. c.). Tout se passe donc comme si le mécanisme par lequel l'O₂ intervient dans la synthèse des enzymes du métabolisme glucidique et établit l'effet Pasteur, différerait d'une façon complémentaire chez les deux anaérobies facultatifs, levure et *E. coli*. *Chez la première, il induit la synthèse des enzymes respiratoires et des enzymes inhibant la fermentation, et n'influence pas la synthèse du système fermentaire ; chez la seconde, il inhibe la formation du système fermentaire sans toucher à celle du système respiratoire.* Cette situation trouve son corollaire dans la profonde différence entre les mécanismes de la respiration « terminale » chez ces deux organismes. KEILIN et HARPLEY (1941) ont montré que le système des cytochromes d'*E. coli* est dépourvu de cytochrome *c* et de cytochrome *c*-oxydase, et AUBEL et SZULMAJSTER (1950) considèrent la consom-

mation d'oxygène par cette bactérie, non pas comme une respiration, mais comme une fixation d'hydrogène actif sur l'accepteur qui ne serait pas activé au préalable. Il est tentant de penser que toutes ces différences résultent des divergences dans l'évolution phylogénétique des microorganismes : les levures sont sélectionnées, dans la nature, dans des conditions de bonne aération, tandis que les milieux naturels dans lesquels *E. coli* évolue sont probablement anaérobies. Un exemple où l'oxygène intervient en changeant l'orientation de la « microévolution » est fourni par l'étude des populations hétérogènes des levures. EPHRUSSI et coll. (1949) ont trouvé qu'une population cellulaire composée au départ presque

TABLEAU XLV

Trois niveaux d'intervention de l'oxygène dans la suppression de la fermentation.

Effet Pasteur	Mécanisme	Niveau de sélection	Inhib. par O ₂ de la ferment.	Exemple
de fonctionnement	O ₂ change l'orientation du métabolisme glucidique en influençant le fonctionnement des enzymes.	Produits du métabolisme glucidique.	Immédiate. Non progressive. N'exige pas l'énergie. Possible en absence de multiplication cellulaire.	Effet Pasteur classique cf. mises au point mentionnées p. 184.
de synthèse	O ₂ change l'orientation des réactions qui aboutissent à la formation des enzymes du métabolisme glucidique.	Enzymes du métabolisme glucidique.	Progressive. Exige l'énergie. Possible en absence de multiplication cellulaire.	O ₂ induit la synthèse des enzymes respiratoires (levure § 4.32). O ₂ induit la synthèse de l'enzyme Pasteur ? (levure § 4.6). O ₂ empêche la synthèse des enzymes fermentatifs ? (<i>E. coli</i> , FOWLER, 1950).
de sélection	O ₂ change l'orientation de la sélection naturelle qui aboutit à des changements de la population cellulaire.	Génotype cellulaire.	Progressive. N'est possible qu'en présence de multiplication cellulaire.	O ₂ induit, dans une population cellulaire mixte, la sélection du type cellulaire « grande » au détriment du type « petite » (levure, EPHRUSSI et coll., 1949).

exclusivement de « petites » (99 % de l'effectif total) évolue en présence de l'air en une population contenant 99 % environ de « grandes ». Des cas analogues, où un type cellulaire qui ne présente pas d'effet Pasteur est remplacé par un autre qui le manifeste, ont été décrits par FINK et BERWALD (1933) et nous l'avons observé à propos d'une levure de brasserie basse. Il est, d'autre part, possible qu'après une culture prolongée en anaérobiose, le génotype « petite colonie » prédomine dans la population, puisque la mutation est irréversible et que l'avantage sélectif des « grandes » semble leur être conféré par la présence d'oxygène.

Les trois niveaux d'intervention de l'oxygène, qui aboutissent tous à la suppression de la fermentation, sont représentés schématiquement dans le tableau XLV, qui résume les différentes modalités de l'effet Pasteur.

5. RÉSUMÉ

Afin d'analyser le rôle joué par le patrimoine héréditaire et par le milieu extérieur dans la génèse des enzymes catalysant les réactions productrices d'énergie, nous avons effectué l'étude physiologique comparée de la levure de boulangerie normale (*Saccharomyces cerevisiae*) et des mutants « petite colonie » qui en dérivent, cultivés en présence et en absence d'oxygène.

Rôle d'un facteur héréditaire dans la formation des enzymes : étude comparée de la mutation « petite colonie ».

EPHRUSSI et ses collaborateurs ont montré que l'apparition des mutants « petite colonie » étudiés ici est due à la perte d'un facteur héréditaire, corpusculaire et extra-nucléaire.

Sur le plan physiologique, ces mutants se caractérisent : *a*) par l'absence totale de la respiration sensible au KCN, par le maintien de la respiration résistante au KCN et de la fermentation aérobie ; *b*) par l'abolition presque complète du catabolisme endogène ; *c*) par le fait que leur fermentation, aussi forte en présence qu'en absence d'oxygène, est moins sensible que la fermentation aérobie des souches normales à l'intoxication par l'acide monoiodo-acétique et plus sensible à celle produite par le fluorure. Ces propriétés métaboliques des mutants sont la manifestation d'un profond remaniement de leur constitution enzymatique. En effet, ils sont dépourvus d'un certain nombre d'enzymes respiratoires (cytochromes *a*, *b*, cytochrome-oxydase, succino-déshydrogénase, Co I H₂-cytochrome *c*-réductase, α -glycérophosphate-déshydrogénase), la teneur de certains autres est diminuée (malico-déshydrogénase liée au Co I), tandis que les teneurs en alcool déshydrogénase et en cytochrome *c* sont augmentées. Les concentrations en déshydrogénase lactique et en catalase sont sensiblement les mêmes que chez les levures normales. En outre, les mutants forment un enzyme nouveau : la malico-cytochrome *c*-réductase, indépendante du coenzyme I, ainsi que le cytochrome *a*₁ absent chez la levure normale. L'étude, chez la levure normale, des enzymes énumérés ci-dessus a permis de préciser l'importance relative, dans le transfert d'hydrogène et d'électrons vers l'oxygène, des réactions individuelles de la respiration terminale. L'analyse du mécanisme par lequel la mutation supprime ou modifie

la formation d'un si grand nombre d'enzymes d'oxydoréduction a été abordée. Elle a montré que la formation de la copule protéique est affectée en premier lieu et que le métabolisme des hémènes est altéré secondairement. D'autre part, le fractionnement par centrifugation des cellules brisées a montré que seuls les enzymes liés aux particules sédimentables font totalement défaut chez le mutant alors que la synthèse des lyoenzymes n'est que faiblement affectée. Le facteur héréditaire cytoplasmique est distinct des enzymes dont il contrôle la formation, mais peut être identique à une fraction des particules sédimentables par centrifugation.

Rôle d'un facteur du milieu extérieur dans la formation des enzymes : étude de l'oxygène.

L'oxygène détermine d'une façon rigoureuse la biosynthèse des enzymes d'oxydoréduction. Lorsque l'on cultive les levures, normale et mutante, en anaérobiose, leurs propriétés métaboliques et leur constitution enzymatique deviennent identiques : le pouvoir respiratoire est aboli, tandis que le pouvoir fermentaire ne l'est pas. Ceci est dû à ce qu'en absence d'oxygène la formation d'un certain nombre d'enzymes est supprimée (cytochrome *a*, *b* et *c*, cytochrome-oxydase, déshydrogénases lactique, succinique, de l' α -glycérophosphate, Co I H_2 -cytochrome *c*-réductase), celle de certains autres ralentie (malico-déshydrogénase liée au Co I) ou accélérée (alcool-déshydrogénase) alors que les nouveaux cytochromes sont formés (a_1 et b_1). En même temps, on constate une excrétion notable des porphyrines éthérosolubles dont la quantité peut correspondre, dans certaines conditions, à la différence entre les teneurs en hémènes de la levure aérobie et de la levure anaérobie. Chez une levure anaérobie l'oxygène induit la synthèse des enzymes d'oxydoréduction même en absence de multiplication cellulaire et conduit au rétablissement de capacité respiratoire. Les limites de l'adaptation à l'oxygène sont clairement définies par le génotype et l'importance d'une source d'énergie utilisable est mise en évidence aussi bien pour la synthèse adaptative des enzymes respiratoires que pour le maintien du pouvoir fermentaire chez une levure cultivée en anaérobiose. En effet, une source exogène d'énergie n'est pas nécessaire dans le cas de la levure normale qui peut utiliser ses réserves endogènes alors qu'elle est indispensable pour le mutant.

Le mécanisme du contrôle par l'oxygène de la biosynthèse des enzymes d'oxydoréduction diffère de celui exercé par le facteur héréditaire cytoplasmique. L'oxygène affecte aussi bien la formation

des desmoenzymes que celle des lyoenzymes et son influence est beaucoup plus considérable pour les enzymes qui ne peuvent fonctionner qu'en sa présence que pour ceux qui peuvent fonctionner en son absence. La transformation induite par l' O_2 des cytochromes b_1 et a_1 en c et a respectivement, comporte en premier lieu le changement des apoenzymes, les modifications du métabolisme des hémines étant la conséquence de ce fait. Une hypothèse sur la formation adaptative des systèmes multi-enzymatiques, fondée sur l'induction bilatérale par l'accepteur et le donateur du transfert, ainsi qu'une interprétation de l'effet Pasteur qui repose sur le rôle de l'oxygène dans la synthèse des catalyseurs sont proposées.

Les enzymes respiratoires étudiés au cours de ce travail catalysent la production d'énergie chez la plupart des cellules animales et végétales. L'exemple de l'interaction entre les facteurs spécifiques intrinsèques et extrinsèques dans la biosynthèse de ces catalyseurs fondamentaux peut donc avoir une portée très générale.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMS, R., ALTSCHUL, A. M. et HOGNESS, T. R. : 1942, *J. Biol. Chem.*, 142, 303.
 ADLER, E., EULER, H. v. et HUGHES, W. : 1938, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 252, 1.
 ADLER, E. et MICHAELIS, M. : 1935, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 235, 154.
 AHLGREN : 1925, *Skand. Arch. Physiol.*, 47, Suppl., 1.
 ALBAUM, H. G., TEPPERMAN, J. et BODANSKY, O. : 1946, *J. Biol. Chem.*, 163, 641.
 ALLWALL : 1929, *Skand. Arch. Physiol.*, 58, 65.
 ALTSCHUL, A. M., ABRAMS, R. et HOGNESS, T. R. : 1940, *J. Biol. Chem.*, 136, 777.
 ALTSCHUL, A. M., PERSKY, H. et HOGNESS, T. R. : 1941, *Science*, 94, 349.
 ANDERSSON, B. : 1933, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 217, 186.
 ANSON, M. L. et MIRSKY, A. E. : 1929, *J. Gen. Physiol.*, 12, 401.
 AUBEL, E. et SZULMAJSTER, J. : 1950, *Biochim. Bioph. Acta*, 5, 228, 255, 499, 515.
 AUBERT, J. P., LEMOIGNE, M. et MILLET, J. : 1952, *C. R. Acad. Sci.*, 234, 140.
 BACH, S. J., DIXON, M. et ZERFAS, L. G. : 1946, *Biochem. J.*, 40, 229.
 BALL, E. G., ANFENSEN, C. B. et COOPER, O. : 1947, *J. Biol. Chem.*, 168, 257.
 BAMMANN, E. et MYRBÄCK, K. : *Die Methoden der Fermentforschung*, 1940-1941, Thieme V, Leipzig.
 BARRON, E. S. G. : 1943, *Adv. Enzym.*, 3, 149.
 BARRON, E. S. G., ARDAO, M. I. et HEARON, M. : 1950, *J. Gen. Physiol.*, 34, 211.
 BARRON, E. S. G., DE MEIO, R. H. et KLEMPERER, F. : 1935-1936, *J. Biol. Chem.*, 112, 625.
 BARRON, E. S. G. et SINGER, T. P. : 1945, *J. Biol. Chem.*, 157, 221 et 241.
 BATELLI, F. et STERN, L. : 1912, *Bioch. Z.*, 46, 317.
 BEADLE, G. W. : 1945, *Chem. Rev.*, 37, 15.
 BEINERT, H. : 1951, *J. Biol. Chem.*, 190, 287.
 BERAUD, P. : 1939-1940, *Ann. Fermentations*, 5, 108.
 BERENBLUM, I., CHAIN, E. et HEATLEY, N. B. : 1939, *Biochem. J.*, 33, 68.
 BERNARD, Claude : 1857, *Leçons sur les effets des substances toxiques*, Baillière, Paris.
 BERNHEIM, F. : 1928, *Biochem. J.*, 22, 1178.
 BERSIN, T. : 1935, *Ergeb. Enzymforsch.*, 4, 68.
 BERSIN, T. : 1940, dans *Handbuch der Enzymologie*, 1, Leipzig.
 BLANCHARD, M. L., KORKES, S., CAMPILLO, A. et OCHOA, S. : 1950, *J. Biol. Chem.*, 187, 875.
 BOREI, H. : 1940, *Arkiv Kemi Mineral. Geolog.*, 13 A, N° 23.
 BOREI, H. : 1950, *Biochem. J.*, 47, 227.
 BOREI, H. et SJÖDEN, A. : 1943, *Arkiv. f. Kemi Miner. et Geolog.*, 16, 1.
 BOYLAND, E. : 1933, *Biochem. J.*, 27, 791.
 BOYLAND, E. et BOYLAND : 1934, *Biochem. J.*, 28, 1417.
 BRACHET, J. : 1944, *Embryologie chimique*, Masson, Paris.
 BRADFIELD, J. R. G. : 1950, *Biol. Rev.*, 25, 113.
 BRIGHT, T. B., DIXON, P. A. et WHYMPER, J. W. T. : 1949, *Nature*, 164, 544.
 BROCKMANN, M. C. et STIER, T. J. B. : 1947, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 29, 1.
 BRODIE, A. F. : 1952, *J. Biol. Chem.*, 199, 835.
 BRODIE, A. F. et GOTS, J. S. : 1951, *Science*, 114, 40.
 BROWN, A. J. : 1905, *J. Chem. Soc. (London)*, 87, 1395.
 BROWN, H. T. : 1914, *Ann. Bot.*, 28, 197.
 BUCHANAN, D. L. et LIENER, I. E. : 1951, *J. Bact.*, 61, 527.
 BÜCHNER, E. : 1897, *Berichte*, 30, 117.
 BURK, D. : 1939, *Cold Spring Harb. Symp.*, 7, 420.
 BURRIS, R. H. et WILSON, P. W. : 1940, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 45, 721.
 CATCHESIDE, D. G. : 1951, *The Genetics of Microorganisms*, Pitman, London.
 CASTOR, J. : 1939, *Thèse*, Harvard University.
 CHAIX, P. et FROMAGEOT, C. : 1942, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 24, 1259.
 CHAIX, P. et KIUN, T. P. : 1943, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25, 1374.
 CHAIX, P. et RONCOLI, G. : 1950, *J. de Physiol.*, 42, 566 ; *Bioch. Bioph. Acta*, 6, 268.
 CHANCE, B. : 1951, dans *The Enzymes*, 2, 397.

- CHANCE, B. : 1952, *Nature*, 169, 215.
- CHANTRENNE, H. : 1943, *Enzymologia*, 11, 213.
- CHANTRENNE, H. : 1947, *Biochim. Biophys. Acta*, 1, 437.
- CHEN, H. K. et TANG, P. S. : 1940, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 16, 293.
- CHEN, S. Y., EPHRUSSI, B. et HOTTINGUER, H. : 1950, *Heredity*, 4, 337.
- CHIN, C. H. : 1950, *Nature*, 165, 926.
- CLARK, W. N. : 1928, *The determination of hydrogen ions*. III. Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- CLARK, H. W., NEUFELD, H. A. et STOTZ, E. : 1951, *Feder. Proceed.*, 10, 173.
- CLAUDE, A. : 1946, *J. Exp. Med.*, 84, 51, 61.
- CLIFTON, E. C. : 1946, *Adv. Enzym.*, 6, 269.
- COHEN, S. S. : 1949, *J. Biol. Chem.*, 177, 607.
- COHN, M. et TORRIANI, A. M. : 1951, *C. R. Ac. Sci.*, 232, 115.
- COMMONER, B. : 1940, *Biol. Rev.*, 15, 168.
- CONWAY, E. J. et DOWNEY, M. : 1950, *Biochem. J.*, 47, 355.
- CORRAN, H. S., GREEN, D. et STRAUB, F. B. : 1939, 33, 793.
- DANIELLI, J. F. : 1951, *Nature*, 168, 464.
- DAS, N. B. : 1937, *Biochem. J.*, 31, 1116, 1124.
- DE LEY, J. : 1949, *Verhand. Konink. Vlaam. Acad. Geneesk. v. België*, XI, N° 3.
- DEWAN, J. G. et GREEN, D. E. : 1937, *Biochem. J.*, 31, 1074.
- DEWAN, J. G. et GREEN, D. E. : 1938, *Biochem. J.*, 32, 626, 1200.
- DICKENS, F. : 1933, *Biochem. J.*, 27, 1141.
- DICKENS, F. : 1951, dans *The Enzymes*, 2, 624, Acad. Press, N. Y.
- DIXON, K. C. : 1937, *Biol. Revs.*, 12, 431.
- DIXON, M. : 1940, *Nature*, 140, 406 et 806.
- DIXON, M. : 1943, *Manometric methods*, IInd Ed., Mac Millan, N. Y.
- DIXON, M. : 1949, *Multi-enzyme systems*, Cambridge Univ. Press.
- DIXON, M. et ZERFAS, L. G. : 1940, *Biochem. J.*, 34, 371.
- DORFMAN, A. : 1943, *Physiol. Rev.*, 23, 124.
- DOUNCE, A. L. : 1950, dans *The Enzymes*, 1, 187 ; Acad. Press, N. Y.
- DUBOS, R. : 1940, *Bact. Rev.*, 4, 1.
- EGAMI, F. et SATO, R. : 1949, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 22, 137.
- EHRlich, P. : 1885, *Das sauerstoff bed. organisms*, Berlin.
- EICHEL, B., WAINIO, W. W., PERSON, W. et COOPERSTEIN, S. J. : 1950, *J. Biol. Chem.*, 183, 89.
- ELION, E. : 1936, *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 18, 165.
- ELLIOT, K. A. C. : 1941, dans *Biokatalyse*, Wien, Springer.
- ELLIOT, K. A. C. et KEILIN, D. : 1934, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 114, 210.
- ENGELHARDT, W. A. : 1946, dans *Congrès des Sciences Pastoriennes*, Paris.
- ENGELHARDT, W. A. et SAKOW, N. E. : 1943, *Biochimia*, 8, 35.
- EPHRUSSI, B. : 1950-1951, *Harvey Lectures*, 46, 45.
- EPHRUSSI, B. et HOTTINGUER, H. : 1950, *Nature*, 166, 956.
- EPHRUSSI, B. et HOTTINGUER, H. : 1951, *Cold Spring Harb. Symp.*, 16, 75.
- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H. et CHIMENES, A. M. : 1949, *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 351.
- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H. et TAVLITZKI, J. : 1949, *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 419.
- EPHRUSSI, B., L'HÉRITIER, Ph. et HOTTINGUER, H. : 1949, *Ann. Inst. Pasteur*, 77, 64.
- EPHRUSSI, B. et SLONIMSKI, P. P. : 1950, *C. R. Ac. Sci.*, 230, 685.
- EPHRUSSI, B. et SLONIMSKI, P. P. : 1950, *Biochim. Biophys. Acta*, 6, 256.
- EULER, H. v., ADLER, E. et GÜNTHER, G. : 1937, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 249, 1.
- EULER, H. v., ADLER, E. et HELLSTRÖM, H. : 1930, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 241, 239.
- EULER, H. v. et GÜNTHER, G. : 1938, *Naturwiss.*, 26, 676.
- EULER, H. v. et HELLSTRÖM, H. : 1938, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 252, 31.
- EULER, H. v., HELLSTRÖM, H. et GÜNTHER, G. : 1930, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 258, 47.
- EULER, H. v. et MYRBÄCK, K. : 1924, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 141, 297 ; 1928, 176, 258.

- FAGUET, M. : 1941, *Thèse Ing. Docteur*, Paris.
- FAURE FREMIET, E. : 1924, *Thèse*, Masson, Paris.
- FINK, H. : 1929, *Biochem. Z.*, 211, 65.
- FINK, H. : 1931, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 195, 215.
- FINK, H. : 1932, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 210, 197.
- FINK, H. et BERWALD, E. : 1933, *Biochem. Z.*, 258, 141.
- FISCHER, F. G. et EYSENBAACH, H. : 1937, *Liebigs Ann.*, 530, 99 ; 532, 1.
- FISCHER, F. G., ROEDIG, A. et RAUCH, K. : 1939, *Naturwiss.*, 27, 197.
- FISCHER, H. : 1924, dans *Oppenheimer*, *Die Fermente u. ihre Wirkung*, Leipzig et Haag.
- FISCHER, H. et coll. : 1924-1927, *H. S. Z. f. Physiol. Chem.*, 130, 302 ; 135, 253 ; 138, 49 ; 138, 288 ; 140, 57 ; 144, 107 ; 150, 243 ; 152, 144 ; 153, 167.
- FISCHER, H. et ORTH, H. : 1937, *Die chemie des pyrrols*, 2, Akad. Verlag. Leipzig.
- FODOR, A. et coll. : 1931, *Biochem. Z.*, 238, 268.
- FODOR, A. et FRANKENTHAL, L. : 1932, *Biochem. Z.*, 246, 414.
- FOULKES, E. C. : 1950, *Biochem. J.*, 48, 378.
- FOWLER, K. : 1951, *Biochim. Bioph. Acta*, 7, 563.
- FREI, W., RIEDMÜLLER, L. et ALMASY, F. : 1934, *Biochem. Z.*, 274, 253.
- FUJITA, A., HATA, T., NUMATA, I. et AJISAKA, M. : 1939, *Biochem. Z.*, 301, 376.
- FUJITA, A. et KODAMA, T. : 1934, *Biochem. Z.*, 273, 186.
- FUJITA, A., YAMAGUTCHI, S. et TAMIYA, H., cité d'après SHIBATA, 1935.
- FÜRTH et LIEBEN : 1922, *Biochem. Z.*, 128, 144.
- GALE, E. F. : 1939, *Biochem. J.*, 33, 1012.
- GALE, E. F. : 1942, *Biochem. J.*, 36, 64.
- GALE, E. F. : 1946, *Adv. Enzymol.*, 6, 1.
- GALE, E. F. : 1951, *The chemical activities of bacteria*, 2nd Ed. University Press, London.
- GLICK, D. : 1949, *Techniques of histo- and cyto-chemistry*. Interscience. New York.
- GREEN, D. E. : 1936 a, *Biochem. J.*, 30, 629.
- GREEN, D. E. : 1936 b, *Biochem. J.*, 30, 2095.
- GREEN, D. E. : 1951, *Biol. Rev.*, 26, 410.
- HAAS, E. : 1934, *Naturwiss.*, 22, 207.
- HAAS, E. : 1943, *J. Biol. Chem.*, 148, 481.
- HAAS, E., HARRER, C. J. et HOGNESS, T. R. : 1942, *J. Biol. Chem.*, 143, 341.
- HAAS, E., HORECKER, B. L. et HOGNESS, T. R. : 1940, *J. Biol. Chem.*, 136, 747.
- HAHN, A. et HAARMANN, W. : 1928, *Z. Biol.*, 87, 465 ; 88, 91.
- HAND, D. B. : 1933, *Erg. Enzymforsch.*, 2, 272.
- HANSEN, Ch. : 1905, *Z. f. Brauerei*, 15, 353.
- HILL, R. : 1930, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 107, 205.
- HILL, R. : 1943, *Biochem. J.*, 37, xxiii.
- HILL, R. : 1951, *Adv. Enzym.*, 12, 1.
- HOGBOOM, G. H. : 1949, *J. Biol. Chem.*, 177, 847.
- HOGBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. et PALLADE, G. E. : 1948, *J. Biol. Chem.*, 172, 619.
- HOOGERHEIDE, J. C. : 1935, *Bijdrage tot de kennis van de reactie van Pasteur*. Sijthoffs, Leiden.
- HOPKINS, F. G., MORGAN, E. Y. et LUTWAK-MANN, C., 1938, *Biochem. J.*, 32, 1829 et 1938.
- HOPKINS, R. H. et ROBERTS, R. H. : 1935, *Biochem. J.*, 29, 919.
- HORECKER, B. L. et KORNBERG, A. : 1948, *J. Biol. Chem.*, 175, 385.
- HOROWITZ, N. H. : 1950, *Adv. Genetics*, 3, 33.
- HUSZAK, S. : 1942, *Biochem. Z.*, 312, 330.
- JEENER, R. : 1948, *Biochim. Bioph. Acta*, 2, 633.
- JOHNS, A. T. : 1951, *Biochem. J.*, 46, 559.
- JÖRGENSEN, A et HANSEN, A : 1948, *Microorganisms and fermentation*. Griffin et Co., London.
- KARSTRÖM, H. : 1937, *Erg. Enzymforsch.*, 7, 350.
- KEILIN, D. : 1925, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 98, 312.

- KEILIN, D. : 1927, *C. R. Soc. Biol.*, 97, 39.
 KEILIN, D. : 1929, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 104, 206.
 KEILIN, D. : 1930, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 106, 418.
 KEILIN, D. : 1933, *Erg. Enzymforsch.*, 2, 254.
 KEILIN, D. : 1934, *Nature*, 133, 290.
 KEILIN, D. : 1936, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 18, 116.
 KEILIN, D. : 1943, *Biochem. J.*, 37, xxi.
 KEILIN, D. et HARPLEY C. H. : 1941, *Biochem. J.*, 35, 688.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1937, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 122, 298.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1938, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 125, 171.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1939, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 127, 167.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1940, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 129, 285.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1940, *Proceed. Roy. Soc. B.*, 129, 277.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1947, *J. Microbiol. Serol.*, 12, 115.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1947, *Biochem. J.*, 41, 491.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1947, *Biochem. J.*, 41, 500.
 KEILIN, D. et HARTREE, E. F. : 1949, *Nature*, 164, 254.
 KEMPNER, W. et GAFFRON, M. : 1939, *Am. J. Physiol.*, 126, 553.
 KENCH, J. E. et WILKINSON, J. F. : 1945, *Nature*, 155, 579.
 KENCH, J. E. et WILKINSON, J. F. : 1946, *Biochem. J.*, 40, 660.
 KLEINZELLER, A. : 1941, *Biochem. J.*, 35, 495.
 KNOX, W. E. et MEHLER, A. H. : 1951, *Science*, 113, 237.
 KREBS, H. A. : 1935, *Biochem. J.*, 29, 1620.
 KREBS, H. A. : 1943, *Adv. Enzym.*, 3, 191.
 KREBS, H. A. : 1949, *1st Int. Congress Biochem.*, Cambridge, p. 336.
 KREBS, H. A. : 1949, *Exp. Ann. Bioch. Medic.*, 10, 31-49.
 KUBOWITZ, F. et HAAS, E. : 1932, *Biochem. Z.*, 255, 247.
 KUBOWITZ, F. et OTT, P. : 1943, *Biochem. Z.*, 314, 94.
- LANDMAN, A. :
- LARDY, H. A. : 1949, dans *Respiratory Enzymes*. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- LASER, H. : 1937, *Biochem. J.*, 31, 1671, 1677.
- LEHNINGER, A. L. : 1951, *J. Biol. Chem.*, 190, 339.
- LEIBOWITZ, J. et HESTRIN, S. : 1945, *Adv. Enzym.*, 5, 87.
- LEMBERG, R. et FALK, J. E. : 1951, *Biochem. J.*, 49, 674.
- LEMBERG, R. et LEGGE, J. W. : 1949, *Haematin compounds and bile pigments*, Interscience Publ., New York.
- LENNERSTRAND, A. : 1936, *Biochem. Z.*, 287, 172.
- LE PAGE, G. A. et SCHNEIDER, W. C. : 1948, *J. Biol. Chem.*, 176, 1021.
- LINeweaver, H. et BURK, D. : 1934, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658.
- LIPMANN, F. : 1933-1934, *Biochem. Z.*, 265, 133 ; 274, 329, 412.
- LIPMANN, F. : 1941, *Adv. Enzym.*, 1, 99.
- LIPMANN, F. : 1942, dans *Symp. Respiratory Enzymes*, Wisconsin Univ. Press, Madison.
- LISON, L. : 1936, *Histochimie animale*, Masson, Paris.
- LOCKHART, E. E. et POTTER, V. R. : 1941, *J. Biol. Chem.*, 137, 1.
- LOHMANN, K. et MEYERHOF, O. : 1934, *Biochem. Z.*, 273, 60.
- LUNDGAARD, E. : 1930, *Biochem. Z.*, 220, 1 et 8.
- LWOFF, A. : 1934, *Zentr. f. Bakt. I*, 130, 497.
- LWOFF, A. : 1943, *L'Evolution Physiologique*, Hermann, Paris.
- LYNEN, F. : 1943, *Liebigs Ann.*, 554, 40.
- LYNEN, F. et NECIULLAH, N. : 1939, *Liebigs Ann.*, 541, 203.
- MAHLER, H. R., SARKAR, N. K., VERNON, L. P. et ALBERTY, R. A. : 1952, *J. Biol. Chem.*, 199, 585.
- MANGENOT, G. et ZWEIBAUM, J. : 1923, *C. R. Soc. Biol.*, 89, 1235.
- MARTIUS, C. et LYNEN, F. : 1950, *Adv. Enzym.*, 10, 167.

- MASSART, L. : 1950, dans *The Enzymes*, 1, 307. Acad. Press, New York.
- MELNICK, J. L. : 1941, *J. Biol. Chem.*, XC.
- MELNICK, J. L. : 1942, *J. Biol. Chem.*, 146, 385.
- MEYERHOF, O. : 1919, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 175, 20.
- MEYERHOF, O. : 1925, *Biochem. Z.*, 162, 43.
- MEYERHOF, O. et FIALA, S. : 1950, *Biochim. Bioph. Acta*, 6, 1.
- MEYERHOF, O. et IWASAKI, K. : 1930, *Biochem. Z.*, 226, 16.
- MEYERHOF, O. et KIESSLING, W. : 1935, *Biochem. Z.*, 276, 239.
- MEYERHOF, O. et LOHMANN, K. : 1926, *Biochem. Z.*, 171, 421.
- MONOD, J. : 1942, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann, Paris
- MONOD, J. : 1944, *Ann. Inst. Pasteur*, 70, 381.
- MONOD, J. : 1947, *Growth Symp.*, 11, 223.
- MONOD, J. : 1949, dans « *Unités biologiques douées de continuité génétique* ». C. N. R. S., Paris.
- MORTON, R. K. : 1950, *Nature*, 166, 1092.
- MULLER, D. : 1933, *Biochem. Z.*, 262, 239.
- MULLER, D. : 1934, *Biochem. Z.*, 268, 152.
- MYRBÄCK, K. et VASSEUR, E. : 1943, *H. S. Z. f. Physiol. Chem.*, 277, 171.
- NEEDHAM, J. : 1942, *Biochemistry and Morphogenesis*, Cambridge Univ. Press.
- NEGELEIN, E. et GERISHER, W. : 1934, *Biochem. Z.*, 268, 1.
- NEGELEIN, E. et WULFF, H. : 1937, *Biochem. Z.*, 289, 436 ; 293, 351.
- NEUBERG, C. et TIR, L. : 1911, *Biochem. Z.*, 32, 323.
- NICKERSON, W. J. et CARROL, W. R. : 1943, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 22, 21.
- NOVELLI, G. D. et LIPMANN, F. : 1950, *J. Biol. Chem.*, 182, 213.
- OCHOA, S. : 1951, *Physiol. Rev.*, 31, 56.
- OGSTON, F. J. et GREEN, D. E. : 1935, *Biochem. J.*, 29, 1983.
- OHLMEYER, P. : 1938, *Biochem. Z.*, 297, 66.
- OPARIN, A. I. : 1938, *The origin of life*, Macmillan, New York.
- OPPENHEIMER, C. : *Die Fermente u. ihre Wirkung*, Leipzig et Haag.
- PAPPENHEIMER, A. M. : 1947, *J. Biol. Chem.*, 167, 251.
- PAPPENHEIMER, A. M. et HENDEE, E. D. : 1947, *J. Biol. Chem.*, 171, 701.
- PAPPENHEIMER, A. M. et HENDEE, E. D. : 1949, *J. Biol. Chem.*, 180, 609.
- PAPPENHEIMER, A. M. et SHASHKAN, E. : 1944, *J. Biol. Chem.*, 155, 265.
- PASTEUR, L. : 1876, *Etudes sur la bière, Œuvres réunies*, t. V., 1928, Masson, Paris.
- PAUL, K. G. : 1949, *Acta Chem. Scand.*, 3, 1178 ; 1950, 4, 239.
- PAUL, K. G. : 1951, dans *The Enzymes*, 2, 358, Acad. Press, New York.
- PETT, L. B. : 1935, *Biochem. J.*, 29, 937.
- PICKETT, M. J. et CLIFTON, C. E. : 1943 a, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 22, 147.
- PICKETT, M. J. et CLIFTON, C. E. : 1943 b, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 21, 77.
- POLLOCK, M. R. : 1950, *Brit. J. Exp. Path.*, 31, 739.
- POLONOWSKI, M. : 1944, *Exp. Ann. Biochim. Medic.*, 4.
- PONGRATZ, E. : 1950, *Helvetica Chimica Acta*, 33, 410.
- POTTER, V. R. : 1946, *J. Biol. Chem.*, 165, 311.
- POTTER, V. R. et ALBAUM, H. G. : 1943, *J. Gen. Physiol.*, 26, 443.
- PRÉVOST, G. : 1950, *Diplôme d'Etudes Supérieures*, Fac. Sci., Paris.
- QUASTEL, J. H. et WHEATLEY, A. H. M. : 1932, *Biochem. J.*, 26, 725, 2169.
- QUASTEL, J. H. et WOOLDRIDGE, W. R. : 1928, *Biochem. J.*, 22, 689.
- RAPKINE, L. : 1933, *C. R. Soc. Biol.*, 112, 790.
- RAPKINE, L. : 1938, *Biochem. J.*, 32, 1729.
- RAWLINSON, W. A. et HALE, J. H. : 1949, *Biochem. J.*, 45, 247.
- REINER, J. M., GEST, M. et KAMEN, M. D. : 1949, *Arch. Biochem.*, 20, 175.
- RILEY, V. : 1950, *Proceed. Soc. Exp. Biol. Medic.*, 75, 644.

- RIMINGTON, C. : 1943, *Nature*, 151, 393.
- ROTHSTEIN, A. et MEIER, R. : 1948, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 32, 77.
- RUNNSTRÖM, J., BOREI, H. et SPERBER, E. : 1939, *Ark. Kem. Miner. Geolog.*, 13 A, N° 22.
- RUNNSTRÖM, J., GURNEY, R. et SPERBER, E. : 1941, *Enzymologia*, 10, 1.
- RUNNSTRÖM, J. et SPERBER, E. : 1938, *Biochem. Z.*, 298, 340.
- SANBORN, R. C. et WILLIAMS, C. M. : 1950, *J. Gen. Physiol.*, 33, 579.
- SAUTON, B. : 1911, *Ann. Inst. Pasteur*, 25, 922.
- SCARISBRICK, R. : 1947, *Ann. Rep. Progress Chem.*, 44, 226.
- SCHAEFFER, P. : 1950, *C. R. Ac. Sci.*, 231, 381.
- SCHAEFFER, P. et SLONIMSKI, P. : 1951, *C. R. Ac. Sci.*, 233, 1692.
- SCHLENK, F. : 1951, dans *The Enzymes*, 2, 316, Acad. Press, New York.
- SCHNEIDER, W. C. : 1946, *J. Biol. Chem.*, 165, 585.
- SCHNEIDER, W. C., CLAUDE, A. et HOGEBOOM, G. H. : 1948, *J. Biol. Chem.*, 172, 451.
- SCHNEIDER, W. C. et HOGEBOOM, G. H. : 1950, *J. Biol. Chem.*, 183, 123.
- SCHNEIDER, W. C. et HOGEBOOM, G. H. : 1951, *Cancer Research*, 11, 1.
- SCHNEIDER, W. C. et POTTER, V. R. : 1943, *J. Biol. Chem.*, 149, 217.
- SHEMIN, D. et WITTENBERG : 1951, *J. Biol. Chem.*, 192, 315.
- SHIBATA, K. : 1935, *Ergeb. Enzymforsch.*, 4, 348.
- SLATER, E. C. : 1949 a, *Biochem. J.*, 44, 305.
- SLATER, E. C. : 1949 b, *Nature*, 163, 532.
- SLATER, E. C. : 1949 c, *Biochem. J.*, 45, 14.
- SLATER, E. C. : 1949 d, *Biochem. J.*, 45, 1.
- SLATER, E. C. : 1950 a, *Biochem. J.*, 46, 499.
- SLATER, E. C. : 1950 b, *Biochem. J.*, 46, 484.
- SLATER, E. C. : 1950 c, *Nature*, 160, 982.
- SLEIN, M. W., CORI, G. T. et CORI, C. F. : 1950, *J. Biol. Chem.*, 186, 763.
- SLONIMSKI, P. : 1949 a, *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 510.
- SLONIMSKI, P. : 1949 b, *Ann. Inst. Pasteur*, 77, 774.
- SLONIMSKI, P. : 1950, *C. R. Acad. Sci.*, 231, 375.
- SLONIMSKI, P. et EPHRUSSI, B. : 1949, *Ann. Inst. Pasteur*, 77, 47.
- SMITH, F. G. et STOTZ, E. : 1949, *J. Biol. Chem.*, 179, 891.
- SPIEGELMAN, S. : 1948, *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 2, 286.
- SPIEGELMAN, S. : 1950, dans *The Enzymes*, 1, 267, Academic Press, New York.
- SPIEGELMAN, S. et NOZAWA, M. : 1945, *Arch. Biochem.*, 6, 303.
- STANIER, R. V. : 1947, *J. Bact.*, 54, 339.
- STANIER, R. V. : 1951, *Ann. Rev. Microbiol.*, 5, 35.
- STEPHENSON, M. : 1949, *Bacterial metabolism 3rd Ed.*, Longmans, London.
- STERN, K. G. : 1939, *Cold Spring Harbor Symp.*, 7, 312.
- STERN, K. G. et MELNICK, J. L. : 1941, *J. Biol. Chem.*, 139, 301.
- STICH, W. : 1950, *Naturwiss.*, 37, 212.
- STICH, W. et EISGRUBER, H. : 1951, *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, 287, 19.
- STIER, T. J. B. : 1939, *Cold Spring Harbor Symp.*, 7, 385.
- STIER, T. J. B. et CASTOR, J. : 1941, *J. Gen. Physiol.*, 25, 229.
- STIER, T. J. B. et MAC INTYRE, C. F. : 1942, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 20, 385.
- STIER, T. J. B., NEWTON, M. L. et SPRINCE, H. S. : 1939, *Science*, 89, 85.
- STIER, T. J. B. et SCALF, R. E. : 1949, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 33, 446.
- STIER, T. J. B., SCALF, R. E. et BROCKMANN, M. C. : 1950, *J. Bact.*, 59, 45.
- STIER, T. J. B., SCALF, R. E. et PETER, C. J. : 1950, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 36, 159.
- STIER, T. J. B. et SPRINCE, H. S. : 1941, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 18, 135.
- STIER, T. J. B. et STANNARD, J. N. : 1936, *J. Gen. Physiol.*, 19, 461 ; 19, 479.
- STIER, T. J. B. et STANNARD, J. N. : 1937, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 10, 79.
- STILL, J. L. : 1940, *Biochem. J.*, 34, 1374.
- STONE, H. W. : 1936, *Ann. Chem. Soc.*, 58, 2591.
- STOTZ, E. : 1942, dans *Symp. Respiratory Enzymes*, Wisconsin, Univ. Press, Madison.
- STOTZ, E. : 1945 : *Adv. Enzym.*, 5, 129.
- STRAUB, F. B. : 1939, *Biochem. J.*, 33, 787.

- STRAUB, F. B. : 1940, *Biochem. J.*, 34, 483.
- SUDA, M., HAYAISHI, O. et ODA, Y. : 1950, *Med. J.*, Osaka Univ., 2, 21 ; 2, 37.
- SWANSON, W. H. et CLIFTON, C. E. : 1948, *J. Bacter.*, 56, 115.
- SUMNER, J. B. : 1941, *Adv. Enzym.*, 1, 163.
- SZENT-GYÖRGYI, A. : 1937, *Studies on biological oxidation*, Stechert, New York.
- TAMIYA, H. : 1942, *Adv. Enzym.*, 2, 183.
- TAMIYA, H. et YAMAGUTCHI, S. : 1933, *Acta Phytochim.*, Japon, 7, 133.
- TANG, P. S. : 1932, *Biol. Bull.*, 61, 468.
- TAVLITZKI, J. : 1949, *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 497.
- THEORELL, H. : 1938, *Biochem. Z.*, 298, 242 ; 1939, 301, 201.
- THEORELL, H. : 1947, *Adv. Enzym.*, 7, 265.
- THOMAS, J. : 1938, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 20, 471, 635, 778, 1058.
- THORP, R. H. : 1941, *Biochem. J.*, 35, 672.
- TRAUTWEIN, K. et WASSERMAN, J. : 1930, *Biochem. Z.*, 229, 128.
- TSOU, C. L. : 1951 a, *Biochem. J.*, 46, 512.
- TSOU, C. L. : 1951 b, *Biochem. J.*, 46, 362.
- TSOU, C. L. : 1951 c, *Biochem. J.*, 46, XLVII.
- TSOU, C. L. : 1951 d, *Biochem. J.*, 49, 658.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. et STAUFFER, J. F. : 1949, *Manometric techniques and tissue metabolism*, Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- UTTER, M. F., KALNITSKY, G. et WERKMAN, C. H. : 1946, *Arch. Biochem.*, 9, 407.
- VAN NIEL, C. B. : 1943, *Ann. Rev. Biochem.*, 12, 551.
- VAN NIEL, C. B. et ANDERSON, E. H. : 1941, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 17, 49.
- VERNON, L. P., MAHLER, H. R. et SARKAR, N. K. : 1952, *J. Biol. Chem.*, 199, 599.
- WAINIO, W. W., COOPERSTEIN, S. J., KOLLEN, S. et EICHEL, B. : *J. Biol. Chem.*, 1948, 173, 145.
- WAINWRIGHT, S. D. et POLLOCK, M. R. : 1949, *Brit. J. Exptl. Path.*, 30, 190.
- WARBURG, O. : 1913, *Pflügers Arch. f. ges. Physiol.*, 154, 599.
- WARBURG, O. : 1927, *Biochem. Z.*, 189, 350.
- WARBURG, O. : 1927, *Biochem. Z.*, 189, 354.
- WARBURG, O. : 1928, *Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs*, tomes I et II, Alcan, Paris.
- WARBURG, O. : 1948, *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*, 2. Aufl., Saengler, Berlin.
- WARBURG, O. : 1949, *Wasserstoff Uebertragende Fermente*, Cantor, Freiburg.
- WARBURG, O. et CHRISTIAN, W. : 1942, *Biochem. Z.*, 310, 384.
- WARBURG, O. et KUBOWITZ, F. : 1928, *Biochem. Z.*, 203, 95.
- WARBURG, O. et NEGELEIN, E. : 1929, *Biochem. Z.*, 214, 64.
- WHELTON, R. et PHAFF, H. J. : 1947, *Science*, 105, 44.
- WIELAND, H. : 1913, *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 46, 3327.
- WINDISCH, F. : 1932, *Biochem. Z.*, 246, 322.
- WINZLER, R. J., BURK, D. et DU VIGNEAUD, V. : 1944, *Arch. Biochem.*, 5, 25.
- WURMSER, R. : 1930, *Oxydations et réductions*, les Presses Universitaires, Paris.
- WURMSER, R. : 1948, dans *Contribution à l'étude de la structure moléculaire*, 247, Desoer, Liège.
- WURMSER, R. : 1949, *Cinétique des réactions biochimiques*, Centre de Documentation Universitaire, Paris.
- WURMSER, R. et FILIPPI-WURMSER, S. : 1938, *C. R. Soc. Biol.*, 127, 471.
- YAKUSHI, E. et OKUNUKI, K. O. : 1940, *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 16, 299.
- YUDKIN, J. : 1938, *Biol. Rev.*, 13, 39.
- ZEILE, K. et RAU, B. : 1937, *H. S. Z. f. Physiol. Chem.*, 250, 197.
- ZETTERSTRÖM, R., ERNSTER, L. et LINDBERG, O. : 1951, *Arch. Biochem.*, 31, 113.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
1. ORIGINE DU TRAVAIL, POSITION DU PROBLÈME ET PLAN DE L'EXPOSÉ.	
2. MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉES	5
2.1. <i>Matériel biologique</i>	5
2.2. <i>Matériel chimique</i>	6
2.3. <i>Méthodes de culture</i>	7
2.31. Milieux de culture	7
2.32. Techniques de culture	8
2.4. <i>Techniques de mesure de la quantité de matière vivante</i>	10
2.41. Numération des cellules	11
2.42. Détermination du poids sec	11
2.43. Détermination de l'azote	13
2.5. <i>Techniques manométriques</i>	14
2.6. <i>Techniques spectroscopiques</i>	14
2.7. <i>Techniques diverses</i>	17
2.71. Préparation du broyat	17
2.72. Dosage du Fer	19
2.8. <i>Abréviations</i>	20
3. RÔLE D'UN FACTEUR HÉRÉDITAIRE DANS LA FORMATION DES ENZYMES : ÉTUDE COMPARÉE DE LA MUTATION « PETITE COLONIE ».	
3.1. <i>Introduction</i>	24
3.2. <i>Métabolisme des cellules intactes</i>	27
3.21. Métabolisme du glucose	27
3.211. Fermentation anaérobie	30
3.212. Respiration et fermentation aérobie	31
3.213. Utilisation d'une quantité limitante de glucose.	33
3.214. Comparaison des différentes souches « grandes » et « petites » ; identité des mutations indépendantes ; permanence du caractère mutant	37
3.22. Métabolisme de quelques sources de carbone en C ₂ , C ₃ et C ₄	39
3.23. Métabolisme endogène	41
3.24. Action des inhibiteurs	45
3.241. Acide monoiodoacétique.	46
3.242. Fluorure de Na.	49
3.243. Cyanure de K	51
3.25. Discussion et conclusions du chapitre 3.2.	54
3.3. <i>Systèmes enzymatiques de la respiration terminale</i>	56
3.31. Spectres d'absorption des cellules intactes	59
3.32. Cytochrome <i>c</i>	62
3.33. Respiration des préparations non-cellulaires	66
3.34. Systèmes enzymatiques oxydant le cytochrome <i>c</i>	68
3.341. Etude des cellules intactes	69
3.3411. Oxydation du cytochrome <i>c</i> « in situ ».	69
3.3412. Oxydation de la diméthyl-p-phénylène-diamine	69

3.342.	Etude des préparations non-cellulaires . . .	71
3.3421.	Détermination de la cytochrome-oxydase.	73
3.3422.	Influence du pH sur l'activité de la cytochrome-oxydase	74
3.3423.	Influence du temps de conservation sur l'activité de la cytochrome-oxydase . .	75
3.3424.	Influence de la concentration en cytochrome <i>c</i> sur l'activité de la cyt.-oxydase.	76
3.3425.	Influence de la concentration du tampon phosphate sur l'activité de la cyt.-oxyd.	78
3.3426.	Influence de la quantité de broyat sur l'activité de la cytochrome-oxydase. .	79
3.3427.	Comparaison de l'activité de la cyt.-oxyd. des souches 59 R et 59 RA.	80
3.35.	Systèmes enzymatiques réduisant le cytochrome <i>c</i>	81
3.351.	Lactico-cyt. <i>c</i> réductase et lactico-BM réductase.	83
3.352.	Succino-cyt. <i>c</i> réductase et succino-BM réductase.	90
3.353.	α -glycérophosphate-cyt. <i>c</i> réductase et α -glycérophosphate-BM réductase	94
3.354.	Malico-cyt. <i>c</i> réductase et malico-BM réductase.	99
3.355.	Alcool-BM réductase	105
3.356.	Co I H ₂ -cyt. <i>c</i> réductase	107
3.36.	Localisation des enzymes à l'aide de la centrifugation fractionnée	111
3.37.	Discussion et conclusion du chapitre 3.3.	115
4.	RÔLE D'UN FACTEUR DU MILIEU EXTÉRIEUR DANS LA FORMATION DES ENZYMES : ÉTUDE DE L'ACTION DE L'OXYGÈNE	126
4.1.	<i>Introduction</i>	126
4.2.	<i>Croissance en aérobiose et en anaérobiose</i>	127
4.3.	<i>Rôle de l'oxygène dans le comportement de la levure normale.</i> . .	131
4.31.	Métabolisme du glucose et les systèmes enzymatiques de la levure cultivée en anaérobiose	131
4.32.	Effet de l'oxygène sur la levure ayant proliféré en anaérobiose	141
4.4.	<i>Rôle de l'oxygène dans le comportement du mutant « petite colonie »</i>	148
4.41.	Perte du pouvoir fermentaire	150
4.5.	<i>Excrétion des porphyrines en aérobiose et en anaérobiose.</i> . . .	157
4.51.	Méthodes d'analyse des porphyrines	157
4.52.	Excrétion des porphyrines	162
4.53.	Nature des porphyrines excrétées	168
4.54.	Discussion du chapitre 4.5.	168
4.6.	<i>Discussion et conclusion du chapitre 4.</i>	170
5.	RÉSUMÉ	193
6.	BIBLIOGRAPHIE	197

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA SEXUALITÉ CHEZ LES BACTÉRIES

Vu et approuvé :

Paris, le 20 avril 1952.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

A. CHÂTELET.

Vu

et permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean SARRAILH.

